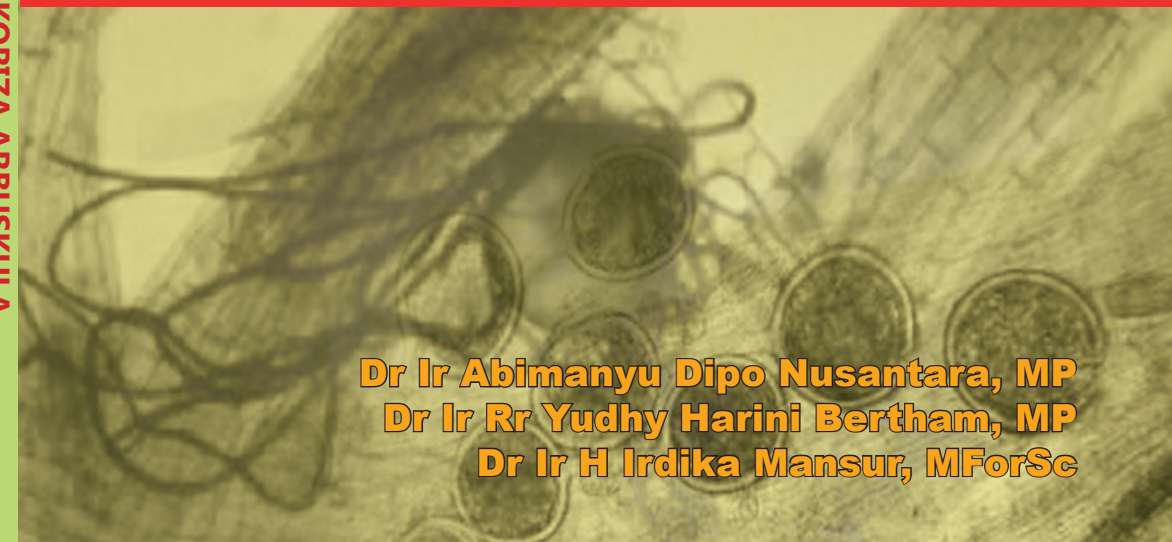




BEKERJA DENGAN FUNGI MIKORIZA ARBUSKULA

# BEKERJA DENGAN FUNGI MIKORIZA ARBUSKULA



**Dr Ir Abimanyu Dipo Nusantara, MP**  
**Dr Ir Rr Yudhy Harini Bertham, MP**  
**Dr Ir H Irdika Mansur, MForSc**



**SEAMEO BIOTROP**

Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology  
Jl. Raya Tajur Km. 6  
Bogor, 16000, Indonesia

Pertanian

ISBN : 978-979-8275-33-3



9 789798 275333



**SEAMEO BIOTROP**

Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology  
[www.biotrop.org](http://www.biotrop.org)

# BEKERJA DENGAN FUNGSI MIKORIZA ARBUSKULA



# BEKERJA DENGAN FUNGI MIKORIZA ARBUSKULA

**Penyusun:**

**Dr. Ir. Abimanyu Dipo Nusantara, M.P**

**Fakultas Pertanian Universitas Bengkulu**

**Dr. Ir. Rr. Yudhy Harini Bertham, M.P**

**Fakultas Pertanian Universitas Bengkulu**

**Dr. Ir. H. Irdika Mansur, M.For.Sc**

**Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor dan SEAMEO BIOTROP**



**SEAMEO BIOTROP**

Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology  
[www.biotrop.org](http://www.biotrop.org)

BEKERJA DENGAN FUNGI MIKORIZA ARBUSKULA

Dr. Ir. Abimanyu Dipo Nusantara, M.P

Dr. Ir. Rr. Yudhy Harini Bertham, M.P

Dr. Ir. H. Irdika Mansur, M.For.Sc

Copyright © 2012 Penulis

Penyunting	: Nia Januarini
Desainer Sampul	: Sani Etyarsah
Penata Isi	: Sani Etyarsah, M. Abdul Nursidik
Korektor	: Yuki HE Frandy
Sumber Foto Sampul	: Abimanyu Dipo Nusantara

First Published 2012 by  
SEAMEO BIOTROP  
Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology  
Jl. Raya Tajur Km 6, Bogor, Indonesia

Cetakan Pertama: Desember 2012  
Dicetak oleh Percetakan IPB

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang  
Dilarang memperbanyak buku ini tanpa izin tertulis dari penerbit

ISBN : 978-979-8275-33-3

# Kata Pengantar

## Direktur SEAMEO BIOTROP

### **Dr. Bambang Purwantara**

SEAMEO BIOTROP adalah pusat penelitian regional Asia Tenggara di bawah Organisasi Menteri-menteri Pendidikan Negara-negara Asia Tenggara (Southeast Asian Minister of Education Organization/ SEAMEO) yang bergerak dalam bidang biologi tropika. Mandat utama dari SEAMEO BIOTROP adalah melakukan penelitian, pelatihan, dan penyebaran informasi dalam rangka pengelolaan sumber daya biologi yang penting untuk meningkatkan kesejahteraan bangsa-bangsa di Asia Tenggara. Untuk melaksanakan mandat tersebut, setiap tahun SEAMEO BIOTROP mengalokasikan dana untuk penelitian, pelatihan, dan penyebaran informasi melalui pencetakan buku, prosiding, jurnal, leaflet, dan brosur.

Dalam kaitannya dengan mikoriza, SEAMEO BIOTROP juga merupakan satu pusat yang turut melakukan penelitian untuk pemanfaatan mikoriza, didukung oleh laboratorium dan fasilitas yang memadai, meskipun mikoriza telah lama dikenal dan diteliti di Indonesia. Minat mahasiswa dan peneliti pemula untuk meneliti mikoriza dari waktu ke waktu terus meningkat, tetapi belum ada buku pegangan yang dapat dijadikan panduan bekerja dengan mikoriza, baik ektomikoriza maupun fungi mikoriza arbuskula (FMA). Oleh karena itu, SEAMEO BIOTROP sangat mendukung penulisan dan penerbitan buku berjudul “Bekerja dengan Fungi Mikoriza Arbuskula” dan sekaligus menyampaikan apresiasi kepada para penulis atas upaya dan kerja kerasnya. Pencetakan buku ini didanai melalui anggaran DIPA SEAMEO BIOTROP tahun 2012.

Kami berharap dengan dipublikasikannya buku ini, akan memberikan manfaat kepada para peneliti, peneliti pemula, dan mahasiswa yang akan bekerja dengan FMA. Semoga penelitian mikoriza, khususnya FMA dapat terus berkembang dan memberikan manfaat yang sebesar-besarnya kepada masyarakat.

Bogor, Oktober 2012

Dr. Bambang Purwantara

# Kata Pengantar

Ucapan puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Swt. yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis berkesempatan menulis buku dengan judul “Bekerja dengan Mikoriza Arbuskula”. Buku ini ditulis berdasarkan pengalaman penulis bekerja di laboratorium. Materi tulisan berasal dari beraneka sumber yang telah dicoba di laboratorium untuk kemudian disesuaikan dengan situasi dan kondisi.

Bekerja dengan fungi mikoriza arbuskula (FMA) tergolong unik. Fungi mikoriza arbuskula merupakan makhluk hidup berukuran renik (mikroskopis) yang perilakunya sering kali tidak terduga karena pengetahuan yang terbatas. Di sisi lain, FMA mudah berkembang biak pada beraneka jenis tanaman inang dan medium tumbuh. Oleh karena itu, bekal keterampilan saja belumlah cukup. Siapa pun yang bekerja dengan FMA hendaknya melengkapi diri dengan pengetahuan yang cukup mengenai FMA. Beraneka sumber baik media cetak maupun sumber-sumber informasi di dunia maya (*internet*) dapat diakses untuk mendapatkan pengetahuan tersebut.

Keberhasilan penulisan buku ini tentu tidak lepas dari perhatian dan uluran tangan berbagai pihak. Oleh karena itu, tidak berlebihan kiranya jika penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada beberapa pihak berikut. Penulis menghaturkan ribuan terima kasih kepada Bapak Dr Bambang Purwantara Direktur SEAMEO-BIOTROP, yang telah memberikan kesempatan dan dorongan sehingga buku ini dapat diterbitkan. Bapak Dr Yadi Setiyadi, Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor yang telah memberikan bimbingan dan arahan, serta kesempatan sehingga penulis mampu memahami dan mendalami fungsi dan peran FMA. Bapak Prof Bambang Hero Dekan Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor yang terus berkomitmen mendorong penulis untuk menjadi rimbawan sejati. Bapak Prof Dwinardi Apriyanto Dekan Fakultas Pertanian

Universitas Bengkulu, atas segala perhatian dan dorongan agar penulis tetap menekuni bidang Biologi Tanah. Para senior dan berbagai pihak lain yang tidak dapat disebut satu per satu atas segala dorongan dan perhatiannya.

Tak ada gading yang tak retak, demikian pesan orang bijak. Penulis menyadari bahwa ilmu dan teknologi mengenai FMA bukanlah sesuatu yang statis, tetapi bersifat dinamis sehingga akan terus berkembang. Penulis berharap isi buku ini bermanfaat bagi para pemula yang ingin bekerja dengan FMA.

Bogor, Oktober 2012

Penulis





# Daftar Isi

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	v
KATA PENGANTAR DIREKTUR SEAMEO BIOTROP .....	vii
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
PENDAHULUAN .....	1
PENGAMBILAN CONTOH TANAH DAN AKAR .....	3
EKSTRAKSI SPORA .....	7
IDENTIFIKASI MORFOLOGI SPORA .....	11
1. Populasi Spora .....	12
2. Pengelompokan ( <i>Grouping</i> ) .....	12
3. Pembuatan Preparat Kering ( <i>Mounting</i> ) .....	13
4. Identifikasi Mikoriza .....	13
PEWARNAAN AKAR .....	17
1. <i>Glomus</i> .....	20
2. <i>Acaulospora</i> .....	21
PENGHITUNGAN POTENSI PROPAGUL .....	31
1. Persiapan Tanah atau Inokulan yang akan Diuji .....	35
2. Persiapan Media Tanam dan Kecambah Inang .....	35
3. Pengenceran Medium .....	36
4. Penanaman Kecambah .....	36
5. Pemanenan dan Pewarnaan Akar .....	37
6. Penghitungan Nilai <i>Most Probable Number</i> (MPN) .....	37
7. MPN dengan Lembar Kerja <i>Microsoft Excell</i> .....	38

PEMBUATAN KULTUR PENANGKARAN ..... 43

PEMBUATAN KULTUR SPORA TUNGGAL ..... 47

1. Perkecambahan Spora In Vitro Metode Giovannetti *et al.* (2003)..... 48

2. Kultur Spora Tunggal ..... 48

TEKNIK INOKULASI..... 53

PRODUKSI INOKULAN ..... 61

    Penetapan Jumlah Pupuk..... 65

MENGUKUR RESPONS TANAMAN  
TERHADAP MIKORIZA ..... 67

1. Mengukur Responss Pertumbuhan Tanaman ..... 68

2. Mengukur Panjang Akar ..... 70

PENUTUP..... 75

SERANAI PUSTAKA..... 77

PROFIL PENULIS ..... 83

# Daftar Tabel

	Halaman
Tabel 1 Nilai <i>Most Probable Number</i> untuk pengenceran 10 kali dan 5 ulangan (Halvorson & Ziegler 1933).....	34
Tabel 2 Pengamatan kolonialisasi akar .....	37
Tabel 3 Contoh format lembar kerja MS. Excell (judul kolom terletak pada baris pertama, yaitu mulai dari A1 s/d K1) .....	39
Tabel 4 Pengamatan peningkatan jumlah propagul infeksi.....	45



# Daftar Gambar

Halaman

Gambar 1	Teknik pengambilan contoh tanah dan akar dari lapangan secara proporsional (kiri dan tengah) dan secara tidak proporsional (kanan) .....	3
Gambar 2	Kombinasi cuka komersial dan tinta tulis warna biru sebagai zat pemasam dan pewarna struktur mikoriza .....	19
Gambar 3	Kenampakan struktur fungi mikoriza pascapewarnaan dengan kombinasi cuka dan tinta. Hifa bercabang seperti huruf H (kiri) sering digunakan sebagai penciri <i>Glomus</i> . Spora berkecambah dan kemudian menjulurkan hifa ke dalam akar tanaman (tengah). Ujung hifa ekstraradikal membengkak dan kemudian membentuk spora (kanan) .....	19
Gambar 4	Beberapa tipe vesikel fungi mikoriza arbuskula pascapewarnaan dengan kombinasi tinta dan cuka komersial .....	20
Gambar 5	Struktur FMA yang berwarna kemerah-merahan akibat pencucian yang kurang intensif, sehingga akar masih bereaksi agak alkalis .....	24
Gambar 6	Peletakan pot untuk menentukan <i>Most Probable Number</i> fungi mikoriza arbuskula dengan cara konvensional (atas) dan yang telah dimodifikasi menggunakan Microsoft Excell .....	41
Gambar 7	Spora diambil dengan pinset dan kemudian diletakkan di permukaan akar tanaman .....	49

Gambar 8	Kultur spora tunggal menggunakan pot plastik (kiri atas), tabung reaksi (atas tengah), dan cawan petri (atas kanan) yang kemudian dipelihara pada bak plastik berisi air (bawah) .....	51
Gambar 9	Rangkaian kegiatan inokulasi pratumbuh.....	56
Gambar 10	Komposisi benih, medium tumbuh, dan propagul pada inokulasi pratumbuh .....	56
Gambar 11	Teknik inokulasi pascatumbuh.....	58

# Pendahuluan

Fungi mikoriza arbuskula (FMA) merupakan simbion tertua yang berhasil dikenali oleh para peneliti. Umur simbion ini ditengarai berkisar 600 juta–1 miliar tahun dan jauh lebih tua dibandingkan dengan umur tanaman monokotil dan dikotil (200 juta tahun), ataupun simbion lainnya (Smith & Read 2008).

Fungi mikoriza arbuskula memiliki kelas tersendiri yaitu Glomeromikota yang memiliki ciri berbeda dibandingkan dengan kerabat dekatnya, yaitu Ascomikota, Basidiomikota, atau kelas fungi lainnya. Berdasarkan kajian biomolekuler dapat diketahui bahwa FMA memiliki empat ordo (Glomerales, Diversiporales, Paraglomerales, dan Archaeosporales), 11 famili, dan 17 genus (Schüssler *et al.* 2001; Schüssler dan Walker 2010). Taksonomi ini akan terus berkembang sejalan dengan kemajuan teknologi. Untuk itu, mereka yang mempelajari mikoriza arbuskula hendaknya sering mengunjungi situs Filogeni FMA (<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo>).

Perbedaan FMA dengan fungi lainnya tidak semata-mata pada ciri morfologi atau molekulernya, tetapi juga karena perbedaan peran fungsional FMA. Peran fungsional FMA sudah cukup banyak diteliti dan diulas oleh para pakar di bidang mikoriza. Fungi mikoriza arbuskula memiliki empat peran fungsional sebagai berikut.

1. Bioprosesor mampu bertindak sebagai pompa dan pipa hidup karena mampu membantu tanaman untuk menyerap hara dan air dari lokasi yang tidak terjangkau oleh akar rambut.
2. Bioprotektor atau perisai hidup karena mampu melindungi tanaman dari cekaman biotika (patogen, hama, dan gulma) dan abiotika (suhu, lengas, kepadatan tanah, dan logam berat).
3. Bioaktivator karena terbukti mampu membantu meningkatkan simpanan karbon di rhizosfer sehingga meningkatkan aktivitas jasad renik untuk menjalankan proses biogeokimia.
4. Bioagregator karena terbukti mampu meningkatkan agregasi tanah.



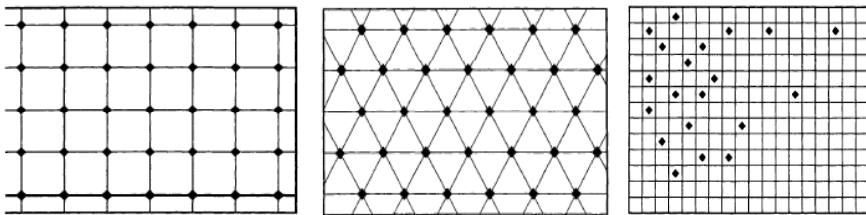
Mengingat peran fungsionalnya tersebut, FMA dapat dimanfaatkan untuk berbagai kepentingan, misalnya (1) meningkatkan jumlah dan mutu hasil tanaman; (2) mengurangi kebutuhan akan pupuk dan pestisida; (3) mengurangi erosi; (4) mereduksi emisi CO<sub>2</sub>; dan (5) menyuburkan tanah. Dengan demikian fungi MA cocok untuk meningkatkan potensi keberhasilan program restorasi lahan pascapenambangan ataupun lahan terdegradasi lainnya.

Propagul FMA (spora, hifa, dan akar terkolonisasi) dapat berkurang atau bahkan lenyap dari dalam tanah karena peristiwa antropogen (aktivitas manusia) maupun bencana alam. Pemupukan dan penggunaan pestisida yang tidak terkendali, penanaman bibit tidak bermikoriza, pengolahan tanah yang berlebihan, dan penanaman tanaman yang tidak bersimbiosis dengan FMA dapat berpengaruh negatif terhadap keberadaan FMA. Alih fungsi lahan dari pertanian menjadi pemukiman, lahan usaha, lahan industri, atau kepentingan lainnya juga dapat mengurangi potensi FMA secara keseluruhan. Bencana alam berupa tanah longsor atau banjir dapat memindahkan potensi FMA dari satu tempat ke tempat lain, sehingga meniadakan potensinya di satu tempat tertentu.

Potensi menguntungkan FMA sudah seharusnya dapat diwariskan kepada generasi yang akan datang. Salah urus lahan merupakan faktor terbesar penyebab musnahnya potensi menguntungkan FMA bagi umat manusia. Oleh karena itu penting artinya untuk memahami teknik atau metode bekerja dengan MA agar sumber daya hayati ini dapat dimanfaatkan untuk sebesar-besar kepentingan umat manusia. Tulisan ini secara ringkas membahas beberapa prosedur yang umum digunakan dalam kajian FMA. Tentu saja tidak semua prosedur dapat dimuat dalam tulisan ini karena sudah banyak yang dipublikasikan oleh para peneliti. Namun demikian, prosedur singkat ini dipandang cukup bermanfaat, khususnya bagi para pemula.

# Pengambilan Contoh Tanah dan Akar

Pengambilan contoh tanah dan akar dari lapangan merupakan kegiatan untuk menyiapkan bahan atau materi yang akan digunakan untuk mempelajari keberadaan dan perilaku propagul FMA (spora, hifa ekstraradikal, akar bermikoriza) yang masih hidup. Hal itu dimaksudkan untuk mempelajari keberadaan dan perilaku propagul FMA (spora, hifa ekstraradikal, akar bermikoriza) yang masih hidup. Prinsip pengambilan contoh tanah dan akar pada kegiatan ini memiliki prinsip yang sama dengan pengambilan contoh tanah untuk analisis fisika, kimia, dan biologi tanah, serta contoh jaringan tanaman. Contoh tanah dan akar dapat diambil secara proporsional (Gambar 1, kiri dan tengah) ataupun nonproporsional (Gambar 1, kanan).



Gambar 1 Teknik pengambilan contoh tanah dan akar dari lapangan secara proporsional (kiri dan tengah) dan secara tidak proporsional (kanan)

Pengambilan contoh tanah atau akar secara proporsional dilaksanakan berdasarkan pola geometris tertentu, sehingga ada jarak yang pasti antara satu titik pengamatan dan titik pengamatan lainnya. Pola ini umumnya dibuat berdasarkan peta yang ada dan tidak terlalu mempertimbangkan kondisi lapangan. Pengambilan contoh nonproporsional ditentukan berdasarkan kondisi lapangan yang ada. Sebagai contoh pengambilan contoh tanah ditentukan berdasarkan sebaran nabatah (*vegetation*) yang tumbuh di

- akar pada bagian leher akar dan kemudian contoh tanah dimasukkan ke dalam kantong plastik secara bersama-sama.
4. Ambil dari beberapa titik pengamatan yang memiliki nabatah yang sama dan jadikan satu agar menjadi contoh komposit. Setiap tanaman inang diwakili oleh satu contoh komposit tanah dan akar. Terkecuali untuk studi keanekaragaman FMA pada individu tanaman atau pohon dari jenis yang sama, maka satu wadah (kantong plastik/kertas) berisi satu tanaman saja.
  5. Lekatkan label pada bagian luar kantong plastik. Label tersebut bertuliskan informasi mengenai tanggal dan lokasi pengambilan contoh, jenis tanaman inang, jenis tanah, tata guna lahan (*land use*), dan informasi lain yang dipandang perlu. Jaga agar tulisan pada label tidak mudah hilang karena basah atau gesekan.
  6. Biarkan kantong plastik tetap terbuka selama beberapa saat. Tujuannya ialah membiarkan contoh tanah sudah cukup dingin dan respirasinya telah berkurang. Adanya uap air pada permukaan dalam plastik menunjukkan contoh tanah masih aktif melakukan respirasi.
  7. Contoh tanah dan akar harus segera diproses sesampainya di laboratorium atau masukkan ke dalam almari pendingin jika tidak dapat langsung diproses.
  8. Contoh tanah dan akar dapat dihancurkan dengan mesin penggiling (blender) jika akan digunakan untuk kultur penangkaran atau ekstraksi spora.
  9. Sebagian akar dicuci bersih kemudian disimpan dalam larutan FAA {formalin + aseton + alkohol 50% (nisbah 90:5:5)}. Simpanan akar ini dapat digunakan untuk menganalisis karakter-karakter morfologi FMA dalam akar, tetapi tidak dapat digunakan untuk analisis keharaan dan biokimia.



3. Sukrosa 60% bobot/volume (larutkan 60 g gula pasir dengan 100 ml air).
4. Satu set penyaring (*sieve*) berukuran garis tengah mata saring 700  $\mu\text{m}$ , 450  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$ , 63  $\mu\text{m}$ , dan 45  $\mu\text{m}$ . Alat penyaring yang digunakan dapat disesuaikan berdasarkan ketersediaan di laboratorium.
5. Piala gelas (*beaker glass*) 500/1.000 ml atau bekas botol air mineral berukuran volume 1 l.
6. Botol film atau tabung sentrifugasi.
7. Cawan Petri.
8. Pinset spora.
9. Mikroskop stereo.

#### **Cara Kerja:**

1. Masukkan contoh tanah ke dalam ember dan kemudian tambah air secukupnya. Aduk dan remas dengan tangan untuk menghancurkan agregat tanah. Keluarkan akar-akar tanaman yang tadinya tersekap di dalam agregat atau bongkah tanah.
2. Akar lebih baik tidak dibuang, harus diikuti untuk prosedur berikutnya, karena hampir semua FMA membentuk spora intraradikal kecuali *Gigaspora*.
3. Masukkan suspensi tanah dan akar ke dalam tabung blender, khususnya untuk bongkah tanah yang sulit dihancurkan dengan tangan. Hancurkan contoh tanah tersebut dengan menekan tombol *start* agar spora terlepas dari agregat hifa yang menempel pada akar atau tanah.
4. Waktu memblender tidak boleh terlalu lama karena justru akan menghancurkan akar yang membuat ekstrak menjadi semakin keruh.
5. Tuangkan suspensi tanah dan akar ke penyaring bertingkat. Bagian teratas ialah penyaring dengan ukuran mata saring terbesar (500  $\mu\text{m}$ ) dan yang paling bawah ialah penyaring dengan ukuran mata saring terkecil (38  $\mu\text{m}$ ). Ukuran mata saring 38–63  $\mu\text{m}$  sudah mampu menangkap sebagian besar spora FMA. Biasanya partikel-partikel liat masih terikut, sehingga mengotorkan hasil penyaringan.

6. Endapan yang ada pada penyaring terbawah (ukuran lubang paling kecil) dipindahkan ke piala gelas (*beaker glass*) dengan bantuan air dari botol semprot.
7. Aduk dan tuangkan ke tabung sentrifugasi. Tinggi ekstrak sebaiknya tidak melebihi 1 cm dan harus tersedia cukup ruangan agar suspensi tidak tumpah.
8. Tuangkan larutan gula 60% ke dalam suspensi tanah sebanyak 2 kali volume ekstrak.
9. Lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama kurang lebih 3 menit atau 2.500 rpm selama 5 menit.
10. Spora akan mengapung pada larutan gula atau bagian atas suspensi jernih.
11. Tuangkan suspensi jernih ke permukaan penyaring berukuran 38  $\mu\text{m}$ , segera bersihkan dengan air mengalir untuk mencegah terjadinya lisis spora.
12. Dengan bantuan semprotan air dari botol semprot, pindahkan spora ke wadah plastik atau cawan petri.



### **Bahan dan Alat:**

1. Spora hasil penyaringan.
2. Larutan PVLG (*polyvinil lactoglycerol*): Larutkan 8,33 g polivinil alkohol dalam campuran 50 ml asam laktat, 5 ml gliserin, dan 50 ml air destilata.
3. Larutan Melzer: Larutkan 1,5 g Iodine dan 5 g KI (*potassium iodine*) dengan 100 ml air destilata. Campurkan larutan tersebut dengan larutan PVLG dengan nisbah 1:1 (volume:volume).
4. Pinset spora, pipet mikro, *object glass*, *cover slip*, piala gelas, dan tusuk gigi.
5. Mikroskop stereo.
6. Mikroskop *compound*.

### **Cara kerja:**

#### **1. Populasi Spora**

- 1.1 Populasi spora ditentukan berdasarkan jumlah spora hasil penyaringan (*sieving*).
- 1.2 Siapkan cawan petri dan buat garis *grid* pada bagian bawahnya, masing-masing selebar 0,5 cm atau 1 cm bergantung kepada jumlah spora. Garis *grid* juga dapat dibuat pada selembar kertas putih yang kemudian dijadikan alas cawan petri.
- 1.3 Tuangkan hasil penyaringan spora (air bercampur spora) ke cawan petri tersebut.
- 1.4 Hitung jumlah spora dengan bantuan mikroskop pada setiap bidang pandang sampai seluruh cawan petri teramati. Jumlah spora dinyatakan dalam jumlah spora per 100 g tanah.

#### **2. Pengelompokan (*Grouping*)**

- 2.1 Siapkan cawan petri dan buat garis *grid* pada bagian alasnya, masing-masing selebar 0,5 cm atau 1 cm bergantung pada jumlah spora. Garis



*grid* juga dapat dibuat pada selembar kertas putih yang kemudian dijadikan alas cawan petri.

- 2.2 Tuangkan hasil penyaringan spora (air bercampur spora) ke cawan petri tersebut.
- 2.3 Amati spora dan kemudian ambil spora dengan pinset spora atau tusuk gigi berdasarkan ciri morfologi kelompoknya (ukuran, warna, lapisan dinding sel, ornamen, dan bentuk hifa yang melekat pada dinding spora).
- 2.4 Letakkan setiap kelompok spora pada cawan petri yang berbeda.
- 2.5 Hasil pengelompokan dapat diberi nama sementara genus FMA dengan ciri spesifik misalnya *Acaulospora* kemerahan, *Gigaspora* kuning, *Glomus* kecil cokelat, atau *Glomus* besar kekuningan.

### 3. Pembuatan Preparat Kering (*Mounting*)

- 3.1 Siapkan *object glass* pada bagian sebelah kiri, teteskan larutan PVLG dan bagian sebelah kanan teteskan larutan Melzer.
- 3.2 Letakkan 5–10 spora sejenis pada setiap tetes larutan tersebut, kemudian masing-masing bagian ditutup dengan *cover slip*.
- 3.3 Pecahkan spora dengan cara menekan permukaan *cover slip* dengan tusuk gigi.
- 3.4 Letakkan *object glass* di bawah mikroskop *compound*.
- 3.5 Bila sudah kering, olesi tepi *cover slip* dengan *cutex* jernih agar *cover slip* tidak lepas, sekaligus mencegah masuknya kotoran.
- 3.6 Amati ciri morfologi spora yaitu berdasarkan ukuran, warna, lapisan dinding sel, ornamen, dan bentuk hifa yang melekat pada dinding spora (*bulbous suspensor*, dudukan hifa, atau *subtending hyphae*).
- 3.7 Ambil gambar spora dengan kamera digital.

### 4. Identifikasi Mikoriza

- 4.1 Berdasarkan identitas morfologinya, mikoriza dapat diidentifikasi sampai

- Hifa membentuk *bulbous suspensor* atau dudukan hifa yang membulat.
- Memiliki sel auksilari (*auxiliary cell*) yang dapat dikatakan sebagai perwujudan vesikula eksternal.
- Warna kuning cerah.

#### 4.6 *Scutellospora*

- Ukuran spora 100–250  $\mu\text{m}$ .
- Lapisan dinding spora tipis ( $\pm 2$  lapis).
- Bereaksi dengan Melzer secara menyeluruh.
- Memiliki ornamen berupa *germination shield*.
- Hifa membentuk *bulbous suspensor* atau dudukan hifa yang membulat.
- Memiliki sel auksilari (*auxiliary cell*) yang dapat dikatakan sebagai perwujudan vesikula eksternal.
- Warna merah cokelat.

#### 4.7 *Acaulospora*

- Ukuran spora 100–200  $\mu\text{m}$ .
- Lapisan luar tidak bereaksi dengan Melzer.
- Lapisan dalam bereaksi dengan Melzer (warna lebih gelap-merah keunguan).
- Memiliki beraneka ornamen bergantung kepada spesiesnya, misalnya berbentuk duri pada *Acaulospora spinosa* dan berbentuk tabung pada *A. tuberculata*.
- Warna dominan merah.
- Memiliki satu cycatrix sebagai tanda.

#### 4.8 *Entrophospora*

- Ukuran 100–200  $\mu\text{m}$ .
- Memiliki lapisan dinding spora, luar dan dalam.
- Warna kuning cokelat.
- Memiliki dua buah cycatrix sebagai tanda.

#### 4.9 Sclerocystis

- Memiliki tandan spora (*sporocarp*).
- Ukurannya sama dengan *Acaulospora*.
- Lapisan dinding menggerombol.
- Tidak bereaksi dengan larutan Melzer.
- Ornamen berlapis dan tidak berlapis.
- Lapisan dalam bereaksi dengan Melzer (warna lebih gelap-merah keunguan).
- Memiliki beraneka ornamen bergantung kepada spesiesnya, misalnya berbentuk duri pada *Acaulospora spinosa* dan berbentuk tabung pada *A. tuberculata*.
- Warna dominan merah.
- Memiliki satu cycatrix sebagai tanda.

#### 4.8 Entrophospora

- Ukuran 100–200  $\mu\text{m}$ .
- Memiliki lapisan dinding spora, luar dan dalam.
- Warna kuning cokelat.
- Memiliki dua buah cycatrix sebagai tanda.

#### 4.9 Sclerocystis

- Memiliki tandan spora (*sporocarp*).
- Ukurannya sama dengan *Acaulospora*.
- Lapisan dinding menggerombol.
- Tidak bereaksi dengan larutan Melzer.
- Ornamen berlapis dan tidak berlapis.

tidak akan membentuk warna biru yang tegas tetapi agak kemerah-merahan. Kemungkinan lainnya ialah biru tripan tidak melekat kuat, sehingga mudah hilang.

Pembersihan akar dengan KOH akan efektif jika contoh akar yang digunakan tidak melebihi 1–2 g. Jika hal ini terjadi, lakukanlah pemotongan akar agar bobotnya berkurang dan jika dicuci harus dihindari kejadian akar saling membelit, sehingga sulit dilepaskan satu dengan lainnya. Akar-akar halus sebaiknya juga dipisahkan dari akar-akar yang berukuran lebih besar.

Senyawa KOH merupakan larutan kimia yang bersifat menimbulkan rasa panas dan iritasi pada kulit. Oleh karena itu, hindarkan agar kulit tidak terkena larutan KOH. Konsentrasi KOH yang digunakan biasanya berkisar 2,5–20% (bobot/volume), tanpa perlu diimbangi dengan konsentrasi HCl yang lebih tinggi. Volume KOH yang digunakan untuk merendam akar harus cukup merendami seluruh akar. Hal itu dilakukan agar pembasahannya seragam akan lebih baik jika akar dipotong agar tidak terlalu panjang atau terlalu menggerombol.

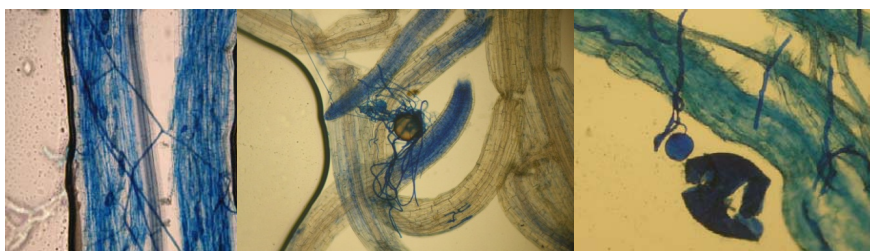
Asam laktat dan gliserin yang digunakan untuk membuat laktogliserol merupakan senyawa kimia yang harganya mahal. Oleh karena itu, penggunaannya harus seefisien dan seefektif mungkin. Biru tripan adalah bubuk beracun dan bersifat karsinogenik, sehingga gunakanlah sarung tangan untuk melindungi jari dari terkena larutan yang mengandung biru tripan. Pilihannya ialah menggunakan metode yang lebih murah, tetapi tetap efektif, misalnya yang menggunakan asam laktat dan gliserin teknis, serta aman yaitu menggunakan anilin biru yang tidak bersifat karsinogenik (Clapp *et al.* 1996).

Cara kerja baku yang digunakan pada dasarnya masih tetap mengacu pada cara kerja Phillips dan Hayman (1970) yang kemudian dimodifikasi dengan tujuan untuk mendapatkan cara kerja yang lebih sederhana, hasilnya akurat, serta aman bagi manusia dan lingkungan. Penggunaan HCl, zat warna biru tripan, gliserol, dan asam laktat sebaiknya dihindari. Hal itu disebabkan selain harganya mahal, juga membahayakan kesehatan peneliti. Penggunaan cuka komersial sebagai bahan pemasam dan tinta tulis merupakan alternatif

yang lebih baik (Vierheilig *et al.* 1998; Nusantara 2011) (Gambar 2 dan 3). Penggunaan otoklaf (15–20 menit, suhu 121°C), air mendidih, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, atau *microwave* sebaiknya digunakan hanya untuk akar yang tua dan berwarna cokelat tua sampai hitam. Hasil penghitungan kolonisasi akar kemudian dikategorikan berdasarkan kriteria Rajapakse dan Miller (1992) atau O'Connor *et al.* (2001). Melalui serangkaian percobaan, Pitet *et al.* (2009) kemudian menyimpulkan bahwa akar yang diwarnai dengan cuka komersial dan tinta tulis tanpa pemanasan tetap dapat digunakan untuk analisis molekuler FMA.



Gambar 2 Kombinasi cuka komersial dan tinta tulis warna biru sebagai zat pemasam dan pewarna struktur mikoriza (Foto: Abimanyu D Nusantara)



Gambar 3 Kenampakan struktur fungi mikoriza pascapewarnaan dengan kombinasi cuka dan tinta. Hifa bercabang seperti huruf H (kiri) sering digunakan sebagai penciri *Glomus*. Spora berkecambah dan kemudian menjulurkan hifa ke dalam akar tanaman (tengah). Ujung hifa ekstraradikal membengkak dan kemudian membentuk spora (kanan) (Foto: Abimanyu D Nusantara)

## 2. *Acaulospora*

- Hifa pada titik masuk (*entry point*) memiliki karakteristik bercabang-cabang. Hifa pada kortek terluar biasanya memiliki percabangan yang lebih tidak teratur, lebih ikal, atau keriting dibandingkan dengan hifa *Glomus*.
- Hifa internalnya berdinding tipis dan sering kali berwarna lebih pucat (pewarnaan lebih lemah), sehingga sulit untuk dilihat. Hal tersebut semakin diperparah dengan adanya jaringan tetes lemak (*lipid droplet*).
- Vesikel pada awalnya berbentuk empat persegi panjang, tetapi sering kali berubah menjadi agak lonjong (*lobed*) karena berkembang ke arah sel-sel yang berdekatan. Vesikel tersebut berdinding tipis dan tidak bertahan lama di dalam akar.

### Alat:

Botol film, botol pereaksi, pinset, gunting, oven, stereomikroskop.

### Metode Phillips dan Hayman (1970) dimodifikasi Laboratorium Bioteknologi Hutan Institut Pertanian Bogor

### Bahan:

1. Air deionisasi atau air destilata.
2. KOH 10% (bobot/volume): masukkan 100 g KOH dalam labu takar 1.000 ml, lalu tambahkan air deionisasi atau air destilata sampai tanda garis.
3. HCl 2% (volume/volume): tuang 20 ml HCl pekat dalam labu takar 1.000 ml, lalu tambahkan air destilata sampai tanda garis.
4. Biru tripan: timbang 0,5 g serbuk biru tripan.
5. Larutan laktogliserin (*destaining*): 400 ml gliserin (teknis) + 400 asam laktat (teknis) + 200 ml air destilata (nisbah 2:2:1).
6. Larutan pewarna biru tripan: 1 l larutan laktogliserin + 0,5 g biru tripan (0,05%).

### **Cara kerja:**

1. Cuci akar sampai bersih dengan air destilata, pencucian 3 kali biasanya sudah cukup bersih.
2. Rendam dalam KOH 10% selama 12 jam atau rendam dalam KOH 10% panas (suhu minimal 90°C) selama 10–30 menit (tergantung kadar lignin atau umur akar).
3. Cuci dengan air 3–5 kali, gunakan penyaring teh sebagai wadah.
4. Apabila akarnya masih tetap berwarna kelam, rendam semalam atau rendam dalam larutan pemutih komersial panas selama 10–30 menit pada suhu minimal 90°C. Kemudian cuci dengan air 3–5 kali. Larutan pemutih komersial sebaiknya diencerkan sekitar 10 kali.
5. Rendam akar dalam HCl 2% selama 12 jam sampai pH larutan mencapai 0,8 – 1,4.
6. Rendam dalam larutan pewarna biru tripan panas, suhu minimal 90°C, atau larutan yang dingin tetapi perendamannya 12–18 jam.
7. Rendam dalam larutan *destaining* untuk menghilangkan kelebihan larutan pewarna biru tripan.
8. Potong akar sepanjang kurang lebih 1 cm dan kemudian letakkan berjajar pada gelas objek. Setiap 5 potong akar ditutup dengan sebuah *cover slip*.

### **Metode Harinikumar dan Bagyaraj (1988)**

#### **Bahan:**

1. Air deionisasi atau air destilata.
2. KOH 10% (bobot/volume): masukkan 100 g KOH dalam labu takar 1.000 ml, lalu tambahkan air deionisasi atau air destilata sampai tanda garis.
3. HCl 2% (volume/volume): tuang 20 ml HCl pekat dalam labu takar 1.000 ml, lalu tambahkan air destilata sampai tanda garis.
4. Larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alkalin: campurkan 3 ml NH<sub>4</sub>OH + 30 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% dan 567 ml air destilata.

2. Rendam dalam KOH 2,5% panas (suhu minimal 90°C) selama 10–30 menit (bergantung kadar lignin atau umur akar).
3. Cuci dengan air 3–5 kali, gunakan penyaring teh sebagai wadah.
4. Apabila akarnya masih tetap berwarna kelam, dididihkan dengan NaOCl 0,6% selama 10–30 menit pada suhu minimal 90°C. Kemudian cuci dengan air 3–5 kali.
5. Rendam akar dalam 20–50 ml HCl 1% selama 12–18 jam sampai pH larutan mencapai 0,8–1,4.
6. Rendam dalam larutan pewarna biru panas, suhu minimal 90°C.
7. Rendam dalam larutan gliserol asam untuk menghilangkan kelebihan larutan pewarna biru.
8. Potong akar sepanjang kurang lebih 1 cm dan kemudian letakkan berjajar pada gelas objek. Setiap 5 potong akar ditutup dengan sebuah *cover slip*.

### **Metode Rajapakse dan Miller (1992)**

#### **Bahan:**

1. Air deionisasi atau air destilata.
2. KOH 10% (bobot/volume): masukkan 100 g KOH dalam labu takar 1.000 ml, lalu tambahkan air deionisasi atau air destilata sampai tanda garis.
3. HCl 1% (volume/volume): tuang 10 ml HCl pekat dalam labu takar 1.000 ml, lalu tambahkan air destilata sampai tanda garis.
4. Larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alkalin: campurkan 3 ml NH<sub>4</sub>OH + 30 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% dan 567 ml air destilata.
5. Larutan laktofenol: campurkan 250 ml asam laktat + 300 g fenol + 250 ml gliserin + 300 ml air destilata.
6. Larutan pewarna biru tripan: 1 l larutan laktogliserol + 0,5 g biru tripan (0,05%).



### Cara kerja:

1. Buang FAA perendam akar dan cucilah akarnya sampai bersih.
2. Rendam akar dalam larutan KOH 10% (b/v) kemudian diotoklaf selama 15 menit pada suhu 120°C, atau panaskan pada suhu 90°C selama 1 jam dalam lemari asam. Jika tidak ada otoklaf, lakukan perendaman dalam KOH selama semalam. Waktu dan suhu pemanasan harus disesuaikan dengan jenis akar yang akan diwarnai. Akar-akar yang berlignin rendah hendaknya menggunakan suhu dan waktu pemanasan yang lebih singkat daripada akar berlignin tinggi.
3. Buang larutan KOH dan cuci contoh akar dengan air mengalir sedikitnya tiga kali sampai tidak terlihat warna cokelat pada air pencuci.
4. Khusus untuk akar yang pigmentasinya tinggi dan jika pembersihan akar dengan larutan KOH tidak berhasil baik, rendam akar dalam larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alkalin pada suhu ruangan selama 10–20 menit sampai akarnya berwarna pucat atau keputih-putihan. Larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> harus dibuat sesaat sebelum digunakan dan tidak dapat disimpan.
5. Cuci dengan air setidak-tidaknya tiga kali.
6. Rendam contoh akar dalam HCl 1% selama 3 menit dan kemudian buang larutan asam tersebut. Contoh akar tidak boleh dicuci lagi dengan air dan harus tetap dalam keadaan asam karena zat pewarna hanya akan bereaksi dalam suasana asam. Apabila akar tidak berwarna kebiruan, misalnya kemerahan yang menunjukkan akarnya belum asam, maka kepekatan HCl dapat dinaikkan.
7. Rendam contoh akar dalam 0,05% biru tripan dalam laktofenol.
8. Lakukan pemanasan dalam otoklaf pada tekanan selama 10 menit pada suhu 120°C atau panaskan pada suhu 90°C dalam lemari asam selama 10–15 menit atau biarkan dalam larutan dingin selama beberapa jam.
9. Buang seluruh larutan pewarna dan gantikan dengan larutan *destaining* (laktogliserol tanpa biru tripan).
10. Jangan sekali-kali mencuci contoh akar setelah dilakukan pewarnaan.

### Metode Clapp *et al.* (1996)

#### Bahan:

1. Air deionisasi atau air destilata.
2. KOH 20% (bobot/volume): masukkan 200 g KOH ke dalam labu takar 1.000 ml, kemudian tambahkan air deionisasi atau air destilata sampai tanda garis.
3. HCl 0,1 M.
4. Larutan *destaining*: 25 ml air destilata dicampur dengan 475 ml asam laktat.
5. Larutan pewarna biru anilina: 0,25 g dicampur anilina biru + 25 ml air destilata + 475 ml asam laktat.

#### Cara kerja:

1. Cuci akar sampai bersih dengan air destilata, pencucian 3 kali biasanya sudah cukup bersih.
2. Rendam dalam KOH 20% selama 1–3 hari (tergantung kadar lignin, umur akar, dan jenis tanaman). Waktu yang tepat dapat ditentukan dengan uji coba.
3. Cuci beberapa kali dengan air, gunakan penyaring teh sebagai wadah, dan kemudian rendam dalam larutan HCl 0,1 M. Jangan dicuci dengan apa pun.
4. Rendam dalam larutan pewarna biru anilina selama 1–3 hari.
5. Rendam dalam larutan *destaining* semalam atau lebih.
6. Potong akar sepanjang kurang lebih 1 cm dan kemudian letakkan berjajar pada gelas objek. Setiap 5 potong akar ditutup dengan sebuah *cover slip*.

### Metode Vierheilig *et al.* 1998 dimodifikasi Nusantara (2011)

#### Bahan:

1. Air deionisasi atau air destilata.
2. KOH 10% (bobot/volume): masukkan 100 g KOH teknis dalam labu

$$\% \text{ akar terkolonisasi} = \frac{\sum \text{bidang pandang bermikoriza}}{\sum \text{bidang pandang yang diamati}} \times 100\%$$

Aras kolonisasi dikategorikan sebagai berikut.

Rajapakse dan Miller (1992)		O'Connor <i>et al.</i> (2001)	
Persen kolonisasi	Kategori	Persen kolonisasi	Kategori
0–5	Kelas 1	0	Tidak dikolonisasi
6–25	Kelas 2	< 10	Rendah
26–50	Kelas 3	10–30	Sedang
51–75	Kelas 4	> 30	Tinggi
75–100	Kelas 5		



yang menunjukkan adanya kolonisasi dan tidak adanya kolonisasi dari tiga pengenceran bertingkat sebagai berikut.

$$a_1n_1 + a_2n_2 + a_3n_3 = \frac{a_1p_1}{1 - e^{-a_1x}} + \frac{a_2p_2}{1 - e^{-a_2x}} + \frac{a_3p_3}{1 - e^{-a_3x}}$$

Tanda subskrip 1, 2, dan 3 merujuk kepada pengenceran pertama, kedua, dan ketiga;  $a_1$ ,  $a_2$ , dan  $a_3$  merupakan jumlah-jumlah atau jumlah-jumlah relatif dari contoh asli yang digunakan sebagai inokulum;  $n_1$ ,  $n_2$ , dan  $n_3$  adalah banyaknya wadah yang diinokulasikan atau lebih umum disebut sebagai ulangan;  $p_1$ ,  $p_2$ , dan  $p_3$  adalah jumlah wadah yang memperlihatkan pertumbuhan atau tanda positif;  $e$  adalah bilangan alam (2,7182818.....) dan  $x$  adalah MPN dari jasad renik yang ada dalam sejumlah inokulum ditambahkan pada pengenceran kedua. Perkalian  $x$  dengan faktor pengenceran akan menghasilkan MPN dari FMA pada contoh asli.

Penyelesaian persamaan untuk mendapatkan nilai  $x$  tersebut secara manual jelas memerlukan waktu dan keahlian tersendiri. Oleh karena itu, demi kepraktisan disusun Tabel MPN untuk kombinasi tertentu dari  $a$  dan  $n$ . Pada Tabel MPN disajikan angka-angka MPN berdasarkan kombinasi nilai  $p_1$ ,  $p_2$ , dan  $p_3$ . Nilai-nilai MPN untuk nisbah pengenceran 10 dan ulangan atau jumlah wadah sebanyak 5 telah disusun oleh Halvorson dan Ziegler (1933). Kesulitan membuat Tabel MPN untuk setiap pengenceran dapat diatasi dengan ditemukannya komputer dan piranti lunak lembar kerja, sehingga memudahkan menyusun skenario penghitungan propagul FMA.

Keberhasilan metode MPN untuk menghitung jumlah propagul infeksi FMA ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu (i) faktor pengenceran, (ii) penanganan contoh atau kultur, (iii) tanaman inang, (iv) lamanya pengujian, dan (v) keberhasilan kolonisasi (Sylvia 1994). Faktor pengenceran merupakan

Tabel 1 Nilai *Most Probable Number* untuk pengenceran 10 kali dan 5 ulangan (Halvorson & Ziegler 1933)

Kode pengenceran		P <sub>3</sub>					
P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	0	1	2	3	4	5
0	0	-	0,018	0,036	0,054	0,072	0,090
0	1	0,018	0,036	0,055	0,073	0,091	0,110
0	2	0,037	0,055	0,074	0,092	0,110	0,130
0	3	0,056	0,074	0,093	0,110	0,130	0,150
0	4	0,075	0,094	0,110	0,130	0,150	0,170
0	5	0,094	0,110	0,130	0,150	0,170	0,190
1	0	0,020	0,040	0,060	0,080	0,100	0,120
1	1	0,040	0,061	0,081	0,100	0,120	0,140
1	2	0,061	0,082	0,100	0,120	0,150	0,170
1	3	0,083	0,100	0,130	0,150	0,170	0,190
1	4	0,110	0,130	0,150	0,170	0,190	0,220
1	5	0,130	0,150	0,170	0,190	0,220	0,240
2	0	0,045	0,068	0,091	0,120	0,140	0,160
2	1	0,068	0,092	0,120	0,140	0,170	0,190
2	2	0,093	0,120	0,140	0,170	0,190	0,220
2	3	0,120	0,140	0,170	0,200	0,220	0,230
2	4	0,150	0,170	0,200	0,230	0,250	0,280
2	5	0,170	0,200	0,230	0,260	0,290	0,320
3	0	0,078	0,110	0,130	0,160	0,200	0,230
3	1	0,110	0,140	0,170	0,200	0,230	0,270
3	2	0,140	0,170	0,200	0,240	0,270	0,310
3	3	0,170	0,210	0,240	0,280	0,310	0,350
3	4	0,210	0,240	0,280	0,320	0,360	0,400
3	5	0,250	0,290	0,320	0,370	0,410	0,450
4	0	0,130	0,170	0,210	0,250	0,300	0,360
4	1	0,170	0,210	0,260	0,310	0,360	0,420
4	2	0,220	0,260	0,320	0,280	0,440	0,500
4	3	0,270	0,330	0,390	0,450	0,520	0,590
4	4	0,340	0,400	0,470	0,540	0,620	0,690
4	5	0,410	0,480	0,560	0,640	0,720	0,810
5	0	0,230	0,310	0,430	0,580	0,760	0,950
5	1	0,330	0,460	0,640	0,840	1,100	1,300
5	2	0,490	0,700	0,950	1,200	1,500	1,800
5	3	0,790	1,100	1,400	1,800	2,100	2,500
5	4	1,300	1,700	2,200	2,800	3,500	4,300
5	5	2,400	3,500	5,400	9,200	16,00	-

**Tujuan:**

Menduga jumlah propagul infeksi dari suatu inokulum (tanah atau pun kultur) dan pendugaan dosis inokulum yang harus diberikan ke tanaman.

**Bahan dan alat:**

Contoh tanah atau inokulum hasil kultur, zeolit atau media tanam steril lainnya, pemutih komersial (Bayclin, So Klin, dan sebagainya), bahan-bahan, alat untuk pewarnaan akar, dan pot plastik.

**Cara kerja:**

**1. Persiapan Tanah atau Inokulan yang akan Diuji**

1. Ambil contoh tanah dari lapangan atau inokulum dari kultur pot.
2. Jika ada akar dalam tanah, periksalah apakah ada kolonisasi FMA atau tidak.
3. Lakukan penyaringan basah pada tanah untuk memeriksa ada atau tidaknya spora.
4. Haluskan contoh tanah dan potong akar menjadi potongan-potongan kecil berukuran kurang lebih 1 cm atau dihancurkan dengan blender, kemudian aduk sampai merata.

**2. Persiapan Media Tanam dan Kecambah Inang**

1. Zeolit atau bahan mineral lainnya dicuci berkali-kali dengan air sampai bersih untuk melenyapkan debu yang melekat pada permukaan bahan. Hal tersebut ditandai dengan air cucian sudah jernih dan tidak keruh.
2. Tiriskan zeolit yang telah dicuci tersebut dan masukkan ke dalam wadah tahan panas untuk disterilkan dalam otoklaf selama 15 menit pada suhu 120°C. Apabila tidak tersedia otoklaf, zeolit dapat direndam dalam air mendidih dan kemudian dijemur.
3. Keluarkan dari otoklaf, setelah dingin rendam dengan larutan hiponeks merah selama 24 jam.
4. Zeolit siap digunakan sebagai media tanam untuk kultur penangkaran (*traping culture*), kultur spora tunggal (*single spore culture*), atau pun

## 5. Pemanenan dan Pewarnaan Akar

1. Pemanenan dilakukan dengan memotong bagian akar tanaman dan kemudian semua akar dicuci bersih menggunakan air mengalir.
2. Rendam dalam larutan FAA jika akar tidak dapat segera diproses atau KOH 10% dingin jika akar langsung diwarnai.
3. Lakukan pewarnaan akar dengan metode pewarnaan akar.
4. Periksa kolonisasi akar di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 atau 100 kali. Jika pada satu potong akar pada satu gelas preparat sudah ditemui adanya kolonisasi, tidak perlu dilakukan pengamatan pada potongan akar lainnya. Segera ganti dengan gelas preparat berikutnya.
5. Catat dalam tabel pengamatan, jika ada kolonisasi akar (ditandai dengan adanya satu atau lebih struktur mikoriza), beri tanda (+) dan jika tidak ada beri tanda (–) seperti contoh di bawah ini.

Tabel 2 Pengamatan kolonialisasi akar

Seri pengenceran	Ulangan					Jumlah kolonisasi
	1	2	3	4	5	
$10^0$	+	+	+	+	+	5
$10^{-1}$	+	+	+	+	+	5
$10^{-2}$	+	+	+	+	+	5
$10^{-3}$	+	+	+	+	+	5
$10^{-4}$	–	–	+	+	–	2
$10^{-5}$	–	–	–	–	+	1
$10^{-6}$	–	–	–	–	–	0

## 6. Penghitungan Nilai *Most Probable Number* (MPN)

1. Pilih tiga seri pengenceran terakhir yang menghasilkan kolonisasi akar. Pada tabel pengamatan di atas ialah 5, 2, 1 dan nyatakan masing-masing sebagai  $P_1$ ,  $P_2$ , dan  $P_3$ .
2. Cocokkan angka  $P_1$ ,  $P_2$ , dan  $P_3$  dengan angka pada Tabel MPN. Hasilnya kemudian dibagi dengan faktor pengenceran pada  $P_2$  untuk mendapatkan



MPN dari contoh asli. Pada contoh ini, kombinasi angka 5, 2, 1 menghasilkan angka 0,700 pada Tabel MPN. Nilai tersebut kemudian dibagi dengan faktor pengenceran  $P_2$  yaitu  $10^{-4}$  atau dikalikan dengan kebalikan faktor pengenceran yang menghasilkan jumlah propagul mikoriza per gram tanah segar ialah sebesar  $0,700 \times 10^4 = 7.000$  propagul per gram bobot tanah atau media yang digunakan. Jika menggunakan contoh tanah segar, hasil tersebut harus dikoreksi dengan kadar air, misalnya kadar air tanah sebesar 10% dan jumlah propagul infektifnya menjadi 7.700 per gram tanah kering mutlak.

3. Selang kepercayaan 95% dapat dihitung berdasarkan rumus:

$$\text{Log } \Omega_{a,b} = \log \text{MPN} \pm 0,326 \text{ di mana } a = \text{atas dan } b = \text{bawah}$$

$$\text{Log } \Omega_{a,b} = \log 0,77 \pm 0,326$$

$$\text{Log } \Omega_a = -0,113509274 + 0,326 = 0,212490725$$

$$\text{sehingga } \Omega_a = 10^{0,212490725} = 1,631138074 \text{ (batas teratas kepercayaan pada probabilitas 95\%)}$$

$$\text{Log } \Omega_b = -0,113509274 - 0,326 = -0,439509274$$

$$\text{sehingga } \Omega_b = 10^{-0,439509274} = 0,363488541 \text{ (batas terendah kepercayaan pada probabilitas 95\%)}$$

Jadi, kisaran jumlah propagul ialah  $0,36 - 1,63 \cdot 10^4$  per gram tanah kering atau bahan.

## 7. MPN dengan Lembar Kerja *Microsoft Excell*

Notasi-notasi berikut akan kita gunakan.

$a$  = volume pengenceran yang digunakan untuk menginokulasi, dengan anggapan hanya menggunakan satu sumber inokulum yang sama untuk seluruh aras pengenceran;

$p$  = banyaknya wadah/ulangan (pot plastik, tabung reaksi, cawan petri, dan sebagainya) yang menunjukkan adanya kolonisasi;

$$\frac{a_1 p_1}{1 - e^{-a_1 x}} + \frac{a_2 p_2}{1 - e^{-a_2 x}} + \frac{a_3 p_3}{1 - e^{-a_3 x}} = a_1 n_1 + a_2 n_2 + a_3 n_3$$

Bagian sebelah kiri dari persamaan tersebut dimasukkan ke kolom L Tabel Contoh Format dalam bentuk rumus berikut.

$$\text{Sel H2} = ((F2 * C2) / (1 - \text{EXP}(-F2 * G2))) + ((F3 * C3) / (1 - \text{EXP}(-F3 * G2))) + ((F4 * C4) / (1 - \text{EXP}(-F4 * G2)))$$

sedangkan bagian kanan dimasukkan ke kolom R Tabel 1 dalam bentuk rumus:

$$\text{Sel I2} = F2 * E2 + F3 * E3 + F4 * E4$$

Persamaan tersebut dapat diselesaikan dengan menggunakan perkakas *Solver* dari Excell yang terdapat pada menu *Tools*. Konfigurasi *default* dari Excell tidak memasukkan perkakas tersebut. Oleh karena itu, para pengguna harus meng-*install* ulang piranti lunak Excell dengan memasukkan *Solver* yang terdapat dalam kelengkapan *Add-Ins*. Persamaan diselesaikan dengan cara menentukan target sel sebagai H2 sama dengan sel yang ada pada kolom R (5,55). Langkah terakhir adalah menentukan sel untuk diselesaikan dalam rangka mempertahankan kesamaan antara H2 dan I2 yang sesuai dengan nilai pada kolom  $x$  (nilai duga MPN).

Nilai probabilitas yang berkaitan dengan kombinasi nilai-nilai  $p$  dan  $q$  yang menghasilkan nilai  $x$  tertentu dimasukkan dalam kolom P. Hal itu akan menghasilkan perkiraan frekuensi dari suatu kombinasi tertentu untuk bilangan  $x$  yang dinyatakan dan diturunkan dari rumus Halvorson dan Ziegler (1933) berikut ini.

$$P = \left( \frac{n_1!}{p_1! q_1!} \right) \left( \frac{n_2!}{p_2! q_2!} \right) \left( \frac{n_3!}{p_3! q_3!} \right) (e^{-a_1 x}) (e^{-a_2 x}) (e^{-a_3 x}) (1 - e^{-a_1 x})^{p_1} (1 - e^{-a_2 x})^{p_2} (1 - e^{-a_3 x})^{p_3}$$

yang kemudian dimasukkan dalam lembar kerja Excell sebagai:

$$\begin{aligned} \text{Sel J2} &= (((\text{FACT}(E2)) / (\text{FACT}(C2) * \text{FACT}(D2)))) * \\ &(((\text{FACT}(E3)) / (\text{FACT}(C3) * \text{FACT}(D3)))) * \\ &(((\text{FACT}(E4)) / (\text{FACT}(C4) * \text{FACT}(D4)))) * \end{aligned}$$



# Pembuatan Kultur Penangkaran

Kultur penangkaran pada dasarnya digunakan untuk menstimulasi sporulasi atau meningkatkan jumlah propagul FMA yang ada di dalam tanah yang diambil dari lapangan. Hal tersebut perlu dilakukan, mengingat tidak semua FMA aktif pada periode waktu yang sama. Sebagian FMA jumlahnya melimpah pada musim hujan, sebagian lainnya pada waktu musim kemarau, dan sebagian lainnya ada sepanjang tahun (Oehl *et al.* 2009).

Kultur penangkaran dibuat dengan cara mencampur tanah atau akar dari lapangan sebagai sumber inokulum dengan medium tumbuh steril dan tanaman inang yang sesuai. Apabila dalam tempo empat bulan tidak dijumpai adanya spora, maka tanaman inang harus dibongkar dan diganti tanaman inang yang baru. Kultur penangkaran dilanjutkan, jika perlu sampai beberapa daur sampai diperoleh spora. Jumlah jenis FMA yang bersporulasi pada umumnya berlipat 2–3 untuk setiap daur kultur. Sekalipun kultur penangkaran memerlukan waktu yang cukup panjang ( $\pm$  3 bulan), tetapi menghasilkan spora segar yang mudah diidentifikasi karakteristik morfologinya.

Tanaman inang merupakan faktor yang penting artinya. Apabila akan digunakan untuk menyelidiki kelimpahan dan keragaman FMA pada satu ekosistem, maka tanaman inang yang digunakan ialah tanaman yang ada di lapangan tempat pengambilan contoh tanah. Penggunaan tanaman inang lain, sekali pun tergolong tanaman yang selama ini diyakini sebagai tanaman *generalist*, sering kali menghasilkan kelimpahan dan keragaman yang jauh berbeda (Eom *et al.* 2000; Vogelsang dan Bever 2009).

## **Tujuan:**

Meningkatkan jumlah propagul infeksi dari contoh tanah yang diambil dari lapangan.

9. Cara pengamatan dilakukan dengan mengambil sedikit akar dan kemudian diletakan di cawan petri yang ditambahkan sedikit air, amati di bawah mikroskop stereo.
10. Untuk memudahkan pencatatan, lakukan penyandian dengan cara sebagai berikut.

M+	: Miselia masih sedikit	S+	: Spora masih sedikit
M++	: Miselia agak banyak	S++	: Spora agak banyak
M+++	: Miselia intensif	S+++	: Spora intensif

11. Buat Tabel 4 Pengamatan peningkatan jumlah propagul infeksi

No.	Tanaman Inang/Ulangan	Pengamatan Perkembangan Mikoriza Dwi Mingguan			
		1	2	3	4
1.	<i>Pueraria</i> – 1				
2.	<i>Pueraria</i> – 2				



## 1. Perkecambahan Spora *In Vitro* Metode Giovannetti *et al.* (2003)

### Tujuan:

Mengecambahkan spora tunggal FMA tanpa tanaman inang.

### Bahan dan Alat:

Spora hasil isolasi dan seleksi, khloramin T, streptomisin, air destilasi, membran selofan, media agar, cawan petri, pinset spora, dan *handcounter*.

### Cara Kerja:

1. Permukaan spora disterilkan dengan cara direndam dalam larutan khloramin T 2% + streptomisin ( $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) selama 20 menit, kemudian dicuci lima kali dengan air destilasi steril.
2. Spora steril langsung diletakkan pada membran selofan (*cellophane membran*) steril (20 x 20 mm) yang terletak di permukaan media agar air 1% pada cawan petri bergaris tengah 9 cm. Untuk setiap isolat dibuat ulangan 10 kali.
3. Cawan petri kemudian ditutup dan dilem dengan parafilm dan diinkubasi dalam ruangan gelap pada suhu kamar (28°C).
4. Setelah inkubasi selama 14–32 hari, kemudian dihitung jumlah spora yang berkecambah, jumlah spora yang tetap tidak berkecambah, dan jumlah spora yang mati.

## 2. Kultur Spora Tunggal

### Tujuan:

Membuat kultur murni FMA berasal dari satu spora.

### Bahan dan alat:

Spora FMA hasil penyaringan (*sieving*) dari tanah, inokulan, atau hasil kultur penangkaran, bibit tanaman inang, media tanam steril, cawan petri plastik, kertas saring, *aluminium foil*, sendok, selotip, pinset spora, pisau pemotong (*cutter*), spidol, kertas *tissue*, kertas label, gunting, dan mikroskop stereo.

7. Cawan petri kemudian ditutup dan bagian sisinya ditutup rapat dengan selotip, kecuali bagian lubang tanaman. Beri tanda dengan spidol letak spora tersebut untuk memudahkan pengamatan berikutnya. Bungkus cawan petri atau tabung reaksi dengan *aluminium foil*. Setiap lima cawan petri dapat dibungkus dengan *aluminium foil*, jaga agar kedua lubang pada cawan petri tidak tertutup oleh *aluminium foil*.
8. Tempelkan kertas label yang sudah ditulis kode isolat, nama tanaman inang, tanggal dimulainya kultur, kode nama pembuat kultur, sumber contoh, dan informasi lain yang dipandang perlu.
9. Letakkan cawan petri atau tabung reaksi pada bak plastik yang berisi air setinggi kurang lebih 1 cm dan kemudian letakkan bak plastik tersebut dalam ruang kultur.
10. Pengamatan dapat dilakukan setiap hari dan dicatat kapan spora mulai berkecambah dan hal-hal lain yang terjadi selama pembuatan kultur.
11. Pemupukan dilakukan dengan menyiram larutan hara berkadar P rendah dan N tinggi, misalnya hiponeks merah (1 g per 2 L air) dengan periode 1 minggu 2 kali (misalnya setiap Senin dan Kamis atau 1 minggu sekali dengan dosis 1 g per L air).
12. Pemangkasan dilakukan 2 minggu atau sebulan sekali, bergantung kepada kerimbunan tanaman. Jika menggunakan *Pueraria*, utamakan membuang sulur-sulur karena dapat mengganggu pengambilan kultur. Tujuan pemangkasan adalah untuk merangsang sporulasi.





Gambar 8 Kultur spora tunggal menggunakan pot plastik (kiri atas), tabung reaksi (atas tengah), dan cawan petri (atas kanan) yang kemudian dipelihara pada bak plastik berisi air (bawah) (Foto: Rr. Yudhy Harini Bertham)



jenisnya. Jika tujuannya untuk budi daya tanaman, inokulasi dapat dilakukan di lahan petani menggunakan inokulum tanah, inokulan hasil penelitian atau produsen tertentu (Feldmann *et al.* 2009), atau benih berlapis inokulum (Daru 2009), pelet atau kapsul berisi inokulum (Bagyaraj 1992). Dalam jangka panjang inokulasi demikian akan sama saja dengan melakukan perbanyakan propagul di lahan petani (Douds *et al.* 2010).

Inokulasi pada dasarnya ialah menghantarkan terbentuknya simbiosis antara FMA dengan tanaman pada suatu kondisi lingkungan tumbuh tertentu. Oleh karena itu, keberhasilan inokulasi dipengaruhi oleh faktor-faktor yang terlibat dalam pembentukan simbiosis MA, misalnya:

1. Kompatibilitas isolat dan inang.
2. Bentuk inokulum (spora, hifa, akar terkolonisasi, bubur akar).
3. Mutu (kerapatan propagul infeksi, nir-kontaminan, nir-patogen) dan jumlah inokulum.
4. Efektivitas isolat pada beberapa jenis tanaman inang, kondisi medium, dan lingkungan pertumbuhan.
5. Teknik inokulasi (waktu, cara, dan tujuan).
6. Umur tanaman yang diinokulasi.
7. Perlakuan saat perkecambahan benih misalnya ada atau tidaknya penambahan senyawa bio-aktif (ekstrak bawang merah, asam humat, dan sebagainya).

**Tujuan:**

Menginokulasikan spora tunggal ke permukaan akar tanaman inang.

**Bahan dan Alat:**

Kultur spora FMA, bibit tanaman yang telah berdaun dua, media tumbuh, pupuk, pinset spora, botol film, pot plastik, cawan petri, dan mikroskop.

**Cara Kerja:****Inokulasi spora tunggal**

1. Siapkan cawan petri dan isi dengan air secukupnya, letakkan bibit tanaman inang yang memiliki dua buah daun. Cawan petri berisi sedikit air untuk menjaga kesejukan bibit.
2. Dekatkan wadah (botol film) berisi spora teridentifikasi ke bawah mikroskop, gunakan tangan kanan untuk mengambil sebuah spora dengan pinset spora.
3. Dengan tangan kiri singkirkan wadah spora tersebut dan ambil cawan petri berisi bibit dan dekatkan ke bagian bawah mikroskop.
4. Tempelkan spora pada permukaan ujung akar, perhatikan lokasinya.
5. Letakkan dengan hati-hati bibit bermikoriza tersebut pada cawan petri atau tabung reaksi berisi substrat lembab, jaga agar spora tidak hilang atau bergeser.

Cara tersebut dapat dimodifikasi dengan meletakkan sebuah spora pada secarik kertas saring atau kertas tisu basah. Kertas tersebut kemudian digunakan untuk membungkus akar tanaman yang diinokulasikan.

**Inokulasi pratumbuh (*layering technique*)**

1. Benih inang didisinfeksi dengan larutan pemutih komersial (Bayclin atau So Klin) selama  $\pm 5-10$  menit.
2. Benih kemudian dicuci dengan air mengalir selama  $\pm 12$  jam sampai bau larutan pemutih komersial hilang sama sekali untuk menjamin agar bebas pestisida atau senyawa kimia lainnya.
3. Siapkan baki atau pot plastik yang permukaannya telah dibersihkan dan bagian bawahnya berlubang-lubang untuk menjaga tidak terjadinya genangan air.
4. Cuci sampai bersih substrat yang akan digunakan. Jika menggunakan zeolit, rendam semalam dalam larutan hiponeks merah ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ). Apabila menggunakan tanah, maka harus dilakukan sterilisasi terlebih dulu.

kapasitas substrat memegang air. Biarkan benih berkecambah, membentuk akar, dan dua buah daun. Larutan hara berkadar P rendah dapat diberikan pada umur 1 minggu setelah benih berkecambah. Pada umur 3–5 minggu, bergantung kepada tinggi rendahnya infektivitas FMA, bibit dapat dianggap telah dikolonisasi oleh FMA dan dapat dipindah ke pot untuk disapih atau digunakan untuk memproduksi inokulan FMA.

### **Inokulasi pascatumbuh**

1. Siapkan pot plastik atau *polybag*/wadah lain yang telah berisi tanah atau substrat steril lainnya.
2. Buat lubang tanam dan masukkan sejumlah inokulum FMA. Letakkan bibit tanaman yang telah memiliki akar, harus dijaga agar akar menempel pada permukaan inokulan, tutup lubang tanam tersebut dengan substrat (Gambar 11).
3. Lakukan pemeliharaan dengan penyiraman dan pemupukan sampai bibit siap dipindah ke lapangan.

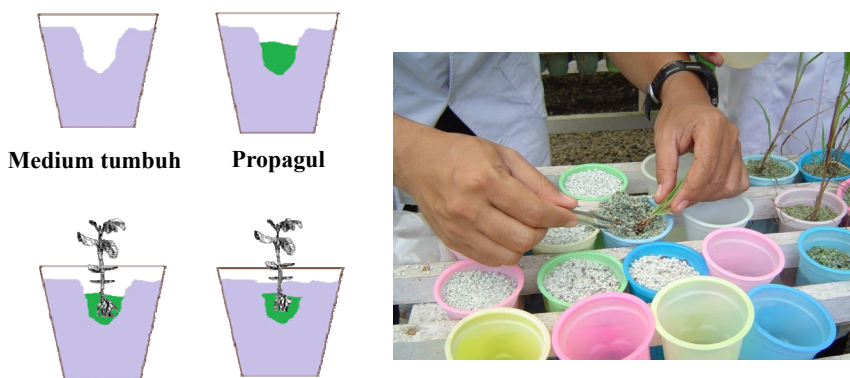
Inokulum dapat diletakkan di antara barisan tanaman (*inter furrow*) atau disebar (*broadcasting*) di permukaan tanah persemaian. Cara ini lebih ekonomis, tetapi tingkat keberhasilannya tidak setinggi cara pertama. Harapannya ialah inokulum segera menyebar di dalam tanah, mengolonisasi akar tanaman, dan membentuk jaringan hifa bawah tanah.

### **Inokulasi di lapangan**

Teknik inokulasi FMA di lapangan dapat dilakukan dengan beberapa cara, di antaranya (1) penanaman bibit bermikoriza; (2) teknik pelapisan benih; (3) teknik pelet dan kapsul; (4) teknik *hydroseeding*; (5) teknik perendaman akar; dan (6) inokulasi pada baris atau antarbarisan tanaman (Bagyaraj 1992; Tallaksen 1997; Gianinazzi *et al.* 2006; Estaún *et al.* 2007; Daru 2009; Vosátka dan Albrechtová 2009).

*Penanaman bibit bermikoriza.* Bibit bermikoriza dapat dihasilkan dari inokulasi pratumbuh atau pascatumbuh/gabungan. Cara gabungan dilakukan dengan menanam bibit bermikoriza hasil inokulasi pratumbuh yang ditanam di persemaian dan kemudian dilakukan inokulasi pascatumbuh. Cara

gabungan ini dilakukan untuk menjamin bibit benar-benar terkolonisasi FMA. Setelah dipelihara dalam waktu secukupnya, bibit bermikoriza dapat ditanam di lapangan.



Gambar 11 Teknik inokulasi pascatumbuh (Foto: Abimanyu Diponusantara)

*Teknik pelapisan benih (seed coating technique).* Teknik ini mirip dengan pelapisan benih dengan inokulan rhizobia. Namun demikian, inokulum FMA berukuran lebih besar dibandingkan dengan bakteri, maka perekatannya menjadi lebih sulit. Oleh karena itu, teknologi ini lebih cocok untuk benih yang berukuran besar, misalnya jeruk, kedelai, jagung, kacang tanah, dan sebagainya. Daru (2009) mengemukakan teknologi pelapisan benih menghasilkan kolonisasi akar yang sama tingginya pada tanaman rumput signal (*Brachiaria decumbens*) dan kudzu (*Pueraria phaseoloides*), tetapi dengan efektivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan inokulasi dalam bentuk granuler dan potongan akar segar. Seterusnya ia menyatakan bahwa perlu diperhatikan kemungkinan adanya senyawa kimia tertentu dalam akar atau benih yang dapat menghambat perkecambahan spora FMA yang diinokulasikan dengan teknologi tersebut.

Adapun prosedurnya ialah sebagai berikut (Daru 2009). Benih didisinfeksi dan dibersihkan dengan air mengalir. Akar bermikoriza dicuci sampai bersih dari semua kotoran yang menempel. Masukkan ke dalam blender dan tambahkan air (nisbah 1:5, b/v), nyalakan blender selama 30

detik. Pindahkan ke gelas piala (*beaker glass*) dan tambahkan bahan perekat secukupnya (*soil fix* sebanyak 1% dari bobot suspensi), kemudian aduk sampai merata. Masukkan benih ke dalam suspensi akar dan diaduk beberapa saat sampai diyakini propagul FMA telah menempel pada permukaan benih. Benih dikeringkan pada suhu kamar selama 2 hari dan siap ditanam di persemaian atau ditaburkan di lapangan.

*Teknik pelet dan kapsul.* Teknik pelet secara teknis lebih mudah dikerjakan dibandingkan dengan teknik pelapisan benih. Pelet pada umumnya berbentuk membulat dengan ukuran sekitar 1 cm. Pelet dibuat dengan mencampur inokulum dan lempung (*clay*) atau gambut. Teknik kapsul dilakukan dengan mengisikan inokulum FMA, bisa juga dicampur dengan inokulan atau bahan lain ke dalam kapsul kosong. Kapsul harus terbuat dari bahan yang mudah hancur, tetapi tidak membentuk senyawa kimia yang menghambat perkecambahan spora dan perkembangan hifa ekstraseluler, serta kolonisasi akar. Pelet dan kapsul kemudian dapat dimasukkan ke dalam lubang tanam atau larikan tanaman.

*Teknik hydroseeding.* *Hydroseeding* merupakan proses penyemburan dengan tekanan suspensi campuran benih, pupuk, bahan perekat, inokulum (FMA dan/atau jasad renik lain), stimulan perkecambahan spora dan kolonisasi FMA misalnya asam humat. Teknologi semacam ini bermanfaat mengatasi kelemahan sifat inokulan FMA kering yang ruah (*bulky*). Jenis tanaman yang digunakan ialah yang benihnya memiliki masa dormansi singkat dan tumbuh cepat di lapangan. Teknik ini umum digunakan pada program restorasi lahan terdegradasi.

*Perendaman akar (root dipping).* Teknik ini dilakukan dengan merendam akar bibit tanaman dalam suspensi berisi inokulum FMA, dapat juga dicampur dengan inokulan jasad renik lain atau bahan yang dapat menstimulasi perkecambahan spora dan perkembangan FMA. Sebaiknya jumlah bibit tanaman per satuan wadah perendaman dibatasi agar tercapai keberhasilan inokulasi yang tinggi.

*Inokulasi pada baris atau antarbaris tanaman.* Meletakkan inokulum pada baris tanaman atau antarbaris tanaman merupakan teknik inokulasi

yang umum dilakukan di lapangan. Kebutuhan inokulan untuk teknologi semacam ini cukup tinggi, yaitu sekitar 20–30 ton per ha. Pascainokulasi perlu dilakukan peningkatan potensi propagul di lapangan, misalnya dengan penambahan asam humat, khitin, pengaturan pola tanam, pengurangan bahan kimia pertanian, dan mengutamakan menanam tanaman yang bersimbiosis dengan FMA.

Keberhasilan inokulasi dapat dipantau dengan beberapa cara. Inokulasi isolat tunggal dapat diamati secara langsung dengan mikroskop tanpa pewarnaan akar, yaitu dengan melihat pembentukan hifa ekstraradikal. Keberhasilan inokulasi pratumbuh dapat dipantau dengan cara membelah substrat diikuti dengan pengamatan hifa ekstraradikal menggunakan kaca pembesar. Keberhasilan inokulasi pascatumbuh dapat diamati melalui pengamatan akar terkolonisasi menggunakan metode pewarnaan akar menggunakan bahan yang murah dan aman bagi pengguna (Nusantara 2011).



Roxb) merupakan tanaman yang sering dianggap *generalist*, sehingga sering digunakan sebagai inang dalam perbanyakan inokulum. Perlu diingat bahwa tidak semua jenis FMA kompatibel dengan semua jenis tanaman inang.

Unsur hara, khususnya P berpengaruh langsung dan tidak langsung terhadap FMA melalui respons tanaman terhadap ketersediaan hara, misalnya dengan mengubah pertumbuhan akar atau fotosintesis. Pembentukan simbiosis mikoriza mencapai maksimum jika kadar P dalam tanah tidak  $> 50 \text{ mg kg}^{-1}$  (50 ppm) (Ishii 2004). Takaran P optimal dipengaruhi oleh bentuk P yang digunakan, anorganik maupun organik atau mudah larut dan tidak mudah larut, serta nisbah C:N:P (Chen *et al.* 2010; Nusantara 2011). Sekali pun unsur P dapat dipastikan berpengaruh besar terhadap pembentukan dan perkembangan FMA (Breuillin *et al.* 2010). Namun, fakta juga menunjukkan bahwa unsur P bukan satu-satunya faktor yang mengendalikan kolonisasi dan sporulasi FMA. Formulasi hara untuk memproduksi inokulan merupakan ranah penelitian yang terbuka lebar, tetapi jarang sekali disentuh oleh para peneliti mikoriza Indonesia.

Kelarutan sumber P juga memegang peranan penting. Bentuk P sulit larut, misalnya tepung tulang terbukti lebih baik pengaruhnya dibandingkan dengan bentuk P mudah larut untuk meningkatkan jumlah spora FMA (Nusantara *et al.* 2011a). Bentuk P organik, misalnya yang berasal dari vermikompos juga terbukti lebih manjur untuk memproduksi spora FMA dibandingkan dengan bentuk anorganik (Nusantara *et al.* 2011b).

Perlakuan terhadap substrat atau pupuk, misalnya sterilisasi dapat berpengaruh terhadap perkembangan FMA (Nusantara 2011). Sterilisasi merupakan tindakan yang dilakukan untuk meniadakan jasad renik pengganggu. Sterilisasi pada produksi inokulum FMA pada dasarnya hanya dilakukan untuk meniadakan isolat FMA lain yang tidak diproduksi. Sterilisasi tidak bertujuan untuk meniadakan sama sekali jasad renik lain yang ada dalam sistem produksi inokulum. Sterilisasi dilaporkan berpengaruh tidak nyata terhadap kolonisasi mikoriza pada tanaman sorgum (Cavender *et al.* 2003) dan kudzu (Nusantara 2011), tetapi menurunkan kolonisasi dan kerapatan spora FMA pada rizosfer tanaman tomat (Manian *et al.* 1995).

Apa pun teknik perbanyakannya, tujuan akhir dari produksi inokulan FMA ialah memproduksi inokulan yang bermutu tinggi dan panggah (*consistent*) hasilnya bagi para pengguna. Bermutu tinggi bermakna bahwa inokulan dengan cepat menghasilkan kolonisasi akar yang tinggi, bebas, atau hanya sedikit mengandung jasad renik lain, khususnya yang bersifat patogen dan efektif meningkatkan pertumbuhan, hasil, dan mutu tanaman inang. Permasalahannya ialah belum ada kriteria dan indikator inokulan FMA di Indonesia (Simanungkalit 2003) maupun di dunia internasional (Douds *et al.* 2005). Para pengguna mau tidak mau harus percaya dengan label pembungkus inokulan. Fakta menunjukkan jumlah spora dan propagul infeksi inokulan akan semakin menurun seiring dengan waktu. Hasil survei pada berbagai inokulan juga menunjukkan informasi yang tertera pada label sering kali tidak dapat terpenuhi ketika dilakukan pengujian (Tarbell dan Koske 2007). Hal yang kurang lagi, belum ada lembaga resmi yang melindungi konsumen inokulan mikoriza. Asosiasi Mikoriza Indonesia semestinya dapat bertindak sebagai lembaga independen untuk melakukan sertifikasi inokulum yang diproduksi di Indonesia maupun yang berasal dari luar negeri.

Sekali pun sulit, bukan berarti kriteria dan indikator mutu inokulan tidak dapat ditetapkan. Ada beberapa kriteria yang mungkin dapat digunakan, misalnya daya tanggap jenis FMA terhadap prosedur produksi inokulum, kemampuan jenis FMA bertahan hidup dalam media, laju mengkolonisasi akar, kemampuan melarutkan sumber hara P sukar larut, kemampuan meningkatkan pertumbuhan dan hasil tanaman inang di rumah kaca dan lapangan, dan lain sebagainya. Indikatornya juga bermacam-macam, misalnya kolonisasi akar, jumlah propagul infeksi atau infektivitas inokulum, panjang dan massa hifa, alih tempat hara, dan efektivitas inokulan. Infektivitas merupakan ukuran seberapa cepat dan seberapa banyak propagul FMA menginfeksi akar tanaman inang tertentu pada kondisi tertentu. Efektif tidaknya inokulan dapat dinilai berdasarkan kemampuan inokulan menghasilkan efek atau pengaruh tertentu. Informasi tersebut wajib dicantumkan pada label.

### **Tujuan:**

Memperbanyak propagul FMA untuk kepentingan penelitian dan komersial.

### **Alat dan Bahan:**

Pot plastik, rak kayu, bak plastik, kaca pembesar, mikroskop, benih tanaman inang (sorgum, jagung, dan kudzu), pot plastik, dan pupuk.

### **Cara kerja:**

1. Rendam benih (*sorghum*, jagung, atau pueraria) dalam larutan pemutih komersial (Bayclin atau Soklin) sambil sesekali diaduk selama kurang lebih 5 menit. Benih biasanya mulai terlihat berwarna putih.
2. Cuci dengan air destilata sampai baunya benar-benar hilang.
3. Rendam dalam air atau air panas sampai airnya mendingin.
4. Siapkan bak plastik yang bagian bawahnya berlubang, isi dengan zeolit steril secukupnya dan kemudian basahi dengan air sampai air menetes dari lubang.
5. Buat larikan pada zeolit dan taburkan benih (*sorghum*, jagung, atau pueraria) yang sudah dibersihkan pada langkah 1–3.
6. Rendam bak plastik tersebut pada bak plastik lain yang berisi air, air jangan sampai berlebih sehingga benih terendam air.
7. Biarkan selama 7 hari dan pertahankan kelembapan zeolit.
8. Ambil bibit tanaman inang yang akar-akarnya masih berwarna putih dan inokulasikan 10 buah spora di bawah mikroskop atau kaca pembesar.
9. Tanamkan bibit terinokulasi tersebut dalam pot plastik berisi kurang lebih 175 g zeolit steril yang sudah dibasahi. Pot plastik ini bentuknya seperti wadah air mineral, tetapi dipilih warnanya yang biru tua. Apabila tidak tersedia yang berwarna, dapat dilakukan pengecatan pada wadah air mineral yang transparan. Ukuran pot plastik dapat diubah tetapi sebaiknya tidak terlalu besar.
10. Rendam pot plastik dalam bak plastik berisi air, perendaman sebaiknya tidak melebihi sepertiga bagian pot plastik. Hal ini untuk mencegah hilangnya spora yang berkecambah jika disiram air dari bagian atas.
11. Biarkan kondisi tersebut selama 14 hari dan setiap 3 hari dilakukan penyiraman dengan larutan hiponeks merah 0,05% (0,5 g per liter) sebanyak 20 ml (bergantung kepada ukuran wadah).

air yang hilang per hari. Larutan pupuk sebanyak 10 ml tersebut harus mengandung 2,8543 mg P atau 0,28543 mg ml<sup>-1</sup> atau 285,43 mg P l<sup>-1</sup> larutan.

4. Pupuk hiponeks merah mengandung 1.09% P atau sehingga untuk itu harus dilarutkan pupuk sebanyak 10,9 mg P per g pupuk. Sistem produksi spora FMA umumnya menggunakan larutan hiponeks merah dengan konsentrasi 0,5 g l<sup>-1</sup>. Hiponeks merah memiliki kadar P sebesar 1,09% sehingga untuk setiap 0,5 g l<sup>-1</sup> pupuk terdapat 5,45 mg P l<sup>-1</sup> larutan. Larutan pupuk hiponeks merah yang diberikan harus bersesuaian dengan laju evaporasi setiap hari atau katakanlah sekitar 11 ml per hari. Larutan pupuk diberikan 2 kali per minggu selama 3 bulan atau total setara dengan 1,4008 mg P.

# Mengukur Respons Tanaman terhadap Mikoriza

Kolonisasi FMA pada akar tanaman menghasilkan dampak yang merentang dari negatif (endofit parasit), netral, sampai positif (mutualis setimbang) (Brundrett 2004). Kolonisasi atau infektivitas yang tinggi tidak selalu berkorelasi positif dengan keuntungan yang didapatkan oleh tanaman inang (Corkidi *et al.* 2004). Simbiosis FMA dikatakan efektif jika mampu menghasilkan pengaruh menguntungkan tertentu terhadap tanaman inang atau lingkungan pertumbuhannya. Ditinjau dari sisi tanaman, inoculan FMA dikatakan efektif jika dapat meningkatkan bobot kering tanaman dan serapan hara, khususnya P (Cavagnaro *et al.* 2003), daya tahan tanaman terhadap kekeringan (Davies *et al.* 2002), atau menangkal patogen (Barea *et al.* 1998). Ditinjau dari sisi lingkungan, inoculan FMA dikatakan efektif jika mampu mengubah karakteristik medium tumbuhnya, misalnya mendorong pembentukan agregat mantap air. Agregat tersebut terbentuk sebagai akibat terbentuknya glomalin yaitu senyawa glikoprotein yang spesifik dibentuk oleh fungi Glomeromikota (Rillig & Mummey 2006).

Keuntungan yang dihasilkan tersebut sudah tentu akan ditentukan oleh kondisi yang memengaruhi simbiosis FMA dan tanaman, seperti jenis FMA, sifat-sifat tanah, jenis dan umur tanaman inang, dan berapa lama keuntungan tersebut diperlukan oleh kedua mitra simbiosis (Nusantara 2011). Oleh karena itu, jauh lebih sulit menilai efektivitas inoculum dibandingkan dengan infektivitas propagul.

Inoculan yang efektif mengkolonisasi akar berpotensi menjadi sumber inoculum yang baik. Efektivitas inoculan FMA bergantung kepada faktor lingkungan dan hayati, khususnya kadar fosfor tanah dan potensi inoculum FMA. Tiap genus mikoriza memiliki perilaku infeksi dan sporulasi yang berbeda-beda pada kondisi lingkungan yang berbeda. *Glomus caledonium* misalnya memiliki daya kolonisasi yang tinggi tetapi sporulasinya rendah pada

$$RPT = \frac{BK_M - BK_{TM}}{BK_{TM}} \times 100\%$$

RPT = respons pertumbuhan tanaman akibat kolonisasi mikoriza

BK = rerata bobot kering oven tanaman

M = bermikoriza

TM = tidak bermikoriza

Rumus ini dapat digunakan untuk menilai kemampuan sejati inokulan FMA untuk menghasilkan pengaruh tertentu pada tanaman atau tanah.

Jika menggunakan medium tumbuh yang tidak steril rumusnya ialah sebagai berikut:

$$RPT = \frac{BK_{TM} - BK_M}{BK_M} \times 100\%$$

Rumus ini dapat digunakan untuk menilai kemampuan bersaing FMA yang diinokulasikan terhadap FMA pribumi yang ada dalam tanah di lapangan.

Kadar hara dan serapan hara fosfor (P) merupakan informasi penting yang ingin diketahui dalam kajian mikorizasi tanaman. Perubahan kadar dan serapan hara akibat kolonisasi FMA dapat dihitung berdasarkan modifikasi rumus di atas menjadi:

$$RKP = \frac{KP_M - KP_{TM}}{KP_{TM}} \times 100\%$$

RKP = respons kadar P tanaman akibat kolonisasi mikoriza

KP = rerata kadar P dalam jaringan tanaman

M = bermikoriza

TM = tidak bermikoriza

Karena serapan hara P merupakan hasil kali bobot kering tanaman dengan kadar hara P maka respons serapan P akibat kolonisasi FMA dapat dihitung dengan rumus:

$$RSP = \frac{SP_M - SP_{TM}}{SP_{TM}} \times 100\%$$

RSP = respons serapan P tanaman akibat kolonisasi mikoriza

SP = rerata serapan P oleh jaringan tanaman

M = bermikoriza

TM = tidak bermikoriza

Penghitungan RKP dan RSP sebaiknya menggunakan dasar bobot kering tajuk atau bagian atas tanaman bukan bobot kering total tanaman. Hal ini disebabkan FMA yang mengkolonisasi akar juga mengandung unsur hara P. Berapa jumlah hara P dalam jaringan FMA tidak diketahui jika tidak dilakukan pengukuran terlebih dahulu. Apabila ingin mengetahui dinamika kadar P dalam akar, maka dapat dihitung Serapan P per satuan bobot kering akar atau disebut Serapan P Spesifik (SPS) (Cavagnaro *et al.* 2003) yang dihitung berdasarkan persamaan sebagai berikut.

$$SPS = \frac{\text{Kadar } P_{t_2} - \text{Rerata kadar } P_{t_1}}{0,5 \times (\text{Bobot kering akar}_{t_2} - \text{Rerata bobot kering akar}_{t_1})}$$

di mana t = waktu panen atau pengambilan contoh tanaman

SPS antara minggu ke 0 dan 6 dihitung menggunakan data kadar P biji untuk t = 0 karena pada saat tersebut belum ada akar dan menggunakan data kadar P total pada minggu ke-6. SPS antara minggu ke 6 dan 9 dihitung berdasarkan kadar P total tanaman, kadar P bagian atas tanaman, bobot kering akar setiap tanaman, dan rerata bobot kering akar. Dasar pertimbangannya sama seperti tadi, dalam angka kadar P total akar terikut angka kadar P dalam struktur FMA.

## 2. Mengukur Panjang Akar

Pengukuran panjang akar ditentukan oleh arsitektur perakaran. Akar tunggang dan akar kasat mata dapat diukur langsung pada kertas grafik. Galat

yang dihasilkan dari pengukuran dengan penggaris umumnya lebih besar daripada kertas grafik. Jika akarnya serabut dan kecil-kecil, tentu akan lebih bijak jika menggunakan metode lain yang lebih akurat hasilnya.

Pada umumnya metode pengukuran akar yang digunakan ialah Metode Perpotongan Garis (*Grid Intersection Method*). Newman (1966) telah mengembangkan rumus panjang akar sebagai berikut.

$$R = \frac{\pi AN}{2H}$$

R = panjang akar total (cm), A = luas area yang dibatasi oleh garis *grid* (cm<sup>2</sup>), N = jumlah perpotongan potongan akar dengan garis *grid*, dan H = panjang total garis *grid* (cm). Semakin panjang akar yang diukur semakin banyak perpotongan garis dengan potongan akar atau semakin panjang akar yang diukur semakin besar nilai N.

Marsh (1971) kemudian menyederhanakan rumus Newman tersebut. Pada persamaan tersebut, nilai besaran A dan H ditentukan oleh lebar garis *grid*, sedangkan  $\pi$  adalah konstanta. Jika lebar *grid* adalah 1,25 cm, maka  $\pi A = 2 H$  dan R (dalam cm) = N. Jika lebar *grid*-nya berbeda kita dapat menggunakan rumus panjang akar yang telah dimodifikasi oleh Tennant (1975), yaitu:

$$R = \frac{W \times N}{1,25} ; W = \text{lebar } grid \text{ dalam cm}$$

Hasil bagi W dengan 1,25 merupakan konstanta. Katakanlah  $\lambda$ , maka rumus di atas oleh Rowell (1995) dimodifikasi menjadi:

$$R = \lambda N$$

Nilai  $\lambda$  berturut-turut adalah 0,393; 0,786; 1,57; atau 3,93 cm untuk setiap perpotongan akar dengan garis *grid* jika lebar garis *grid*-nya adalah 0,5, 1, 2, atau 5 cm. Kebenaran rumus tersebut dapat diuji dengan menggunakan benang yang sudah diukur panjangnya terlebih dulu.

Pengukuran panjang akar ini penting artinya karena dapat digunakan untuk mengukur panjang akar terkolonisasi FMA. Panjang akar dan bobot



akar terkolonisasi dapat diukur berdasarkan hasil kali persen kolonisasi akar dengan panjang dan bobot akar (Rajapakse & Miller 1992).

**Tujuan:**

Mengukur perubahan panjang akar akibat kolonisasi mikoriza.

**Alat dan Bahan:**

Kertas bergaris, plastik bening, pena, penggaris, dan akar bermikoriza.

**Cara Kerja:**

1. Siapkan selembat kertas grafik atau plastik bening bergaris, buat garisnya dengan pena yang paling tipis. Plastik lebih disukai karena lebih awet dan tidak terbasahkan, sehingga aman dari kemungkinan robek. Jarak antargaris atau *grid* disesuaikan dengan ukuran akar. Untuk akar yang panjangnya kurang dari 1 m, buat lebar *grid*-nya sebesar 1 cm. Jika panjangnya sampai 5 m, buat lebar *grid*-nya 2 cm dan jika panjang akarnya > 5 m, buat lebar *grid*-nya selebar 5 cm.
2. Selain kertas atau plastik, bisa juga menggunakan cawan petri yang berisi air. Kertas bergaris dapat diletakan di bagian bawah cawan petri. Cara ini menghilangkan kewajiban mengeringkan akar.
3. Potong secara acak akar yang sudah dicuci bersih dan ditiriskan pada selembat kertas (bisa menggunakan kertas apa saja).
4. Potongan akar ditaburkan secara acak pada kertas grafik atau plastik bergaris atau cawan petri, jaga agar tidak ada potongan akar yang saling menumpuk.
5. Hitung jumlah perpotongan antara potongan akar dengan garis-garis *grid* (N).



# Penutup

Fungi mikoriza arbuskula merupakan anugerah Allah Swt. kepada umat manusia. Manfaatnya untuk mendukung produktivitas tanaman dan lingkungan yang tidak perlu diragukan lagi. Namun, propagul atau inokulum FMA dapat musnah dari muka bumi akibat bencana alam atau kelalaian umat manusia. Hal tersebut menjadi tanggung jawab umat manusia, khususnya para akademisi dan pencinta FMA untuk menjaga kelestarian FMA agar dapat terwariskan kepada generasi yang akan datang. Pemahaman mengenai FMA, mulai dari teknik isolasi dan identifikasi sampai perbanyakan massal propagul menjadi penting artinya agar FMA dapat terlestarikan.

Adanya dampak positif FMA terhadap tanaman dan lingkungan semestinya menyadarkan kita semua. Penggunaan inokulum FMA sebagai bahan pelengkap pupuk mestinya harus semakin luas, apalagi belakangan ini harga pupuk semakin mahal dengan meningkatnya harga bahan bakar minyak. Tidak semua kondisi tanah, misalnya tanah bekas tambang, respons terhadap pupuk buatan. Penanaman bibit bermikoriza dapat menjadi salah satu alternatif pada kondisi tersebut. Namun, produksi inokulan FMA menjadi salah satu kendala penerapan FMA di lapangan dalam skala besar. Para peneliti mikoriza masih harus bekerja keras untuk mendapatkan teknologi produksi inokulum yang handal, menentukan kriteria dan indikator baku mutu inokulum, dan mensosialisasikan manfaat penggunaan inokulum mikoriza bagi para petani dan dunia usaha.



# Senarai Pustaka

- Bagyaraj DJ. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhiza: application in agriculture. *Methods Microbiol.* 24: 359–373.
- Barea JM, Andrade G, Bianciotto V, Dowling D, Lohrke S, Bonfante P, O’Gara F, Azcon-Aguilar C. 1998. Impact on arbuscular mycorrhiza formation of pseudomonas strains used as inoculants for bio-control of soil-borne fungal plant pathogens. *Appl Environm Microbiol.* 64(6):2304–2307.
- Breuillin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P, Druege U, Hause B, Bucher M, Kretzschmar T, Bossolini E, Kuhlemeier E, Martinoia E, Franken P, Scholz U, Reinhardt D. 2010. Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in petunia hybrida and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *The Plant Journal.* 64:1002–1017.
- Brundrett MC, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Brundrett MC. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol Rev.* 78:473–495.
- Cavagnaro TR, Smith FA, Ayling SM, Smith SE. 2003. Growth and phosphorus nutrition of a *paris*-type arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 157:127–134.
- Cavender ND, Atiyeh RM, Kneel M. 2003. Vermicompost stimulates mycorrhizal colonization of roots of sorghum bicolor at the expense of plant growth. *Pedobiologia.* 47:85–89.
- Chen MM, Yin HB, O’Connor P, Wang YS, Zhu YG. 2010. C:N:P Stoichiometry and specific growth rate of clover colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil.* 326:21–29.
- Clapp JP, Fitter AH, Merryweather JM. 1996. Arbuscular Mycorrhiza *dalam* Hall GS, Lasserre P, Hawksworth DL. (eds.). *Methods for the Examination of Organismal Diversity in Soils and Sediments*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International. Hlm. 145–161.

- Corkidi L, Allen EB, Merhaut D, Allen MF, Downer J, Bohn J, Evans M. 2004. Assessing the infectivity of commercial mycorrhizal inoculants in plant nursery conditions. *J Environ Hort.* 22(3):149–154.
- Daru TP. 2009. Teknik Pengembangan Tanaman Penutup Tanah pada Lahan Reklamasi Tambang Batu Bara sebagai Pastura [Disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, IPB.
- Davies Jr, FT, Olalde-Portugal V, Aguilera-Gomez K, Alvarado MJ, Ferrera-Cerrato RC, Boutton TW. 2002. Alleviation of drought stress of chile ancho pepper (*Capsicum annuum* L. cv. San Luis) with arbuscular mycorrhiza indigenous to Mexico. *Scientiae Hort.* 92:347–359.
- Douds DD Jr, Nagahashi G, Hepperly PR. 2010. On-Farm production of inoculum of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and assessment of diluents of compost for inoculum production. *Bioresour Technol.* 101: 2326–2330.
- Douds DD Jr, Nagahashi G, Pfeffer PE, Kayser WM, Reider C. 2005. On-Farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum. *Can J Plant Sci.* 85:15–21.
- Eom AH, Hartnett DC, Wilson GWT. 2000. Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia.* 122:435–444.
- Estaún V, Vicente S, Calvet C, Camprubí A, Busquets M. 2007. Integration of arbuscular mycorrhiza inoculation in hydroseeding technology: effects on plant growth and inter-species competition. *Land Degrad Develop.* 18:621–630.
- Feldman F, Idczak E. 1992. Inoculum Production of Vesicular–Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Use in Tropical Nurseries. *Methods in Microbiol.* 24:339–357.
- Feldmann F, Hutter I, Schneider C. 2009. Best production practice of arbuscular mycorrhizal inoculum. *Soil Biol.* 18:319–335.
- Gianinazzi S, Plumey-Jacquot E, Gianinazzi-Pearson V, Leyval C. 2006. Contribution of arbuscular mycorrhiza to soil quality and terrestrial ecotoxicology dalam Bloem J, Hopkins W, Benedetti A. (eds.). *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. Wallingford, UK: CAB International. Hlm. 248–256.

- Giovannetti M, Sbrana C, Strani P, Agnolucci M, Rinaudo V, Avio L. 2003. Genetic diversity of isolates of *glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Appl Environm Microbiol.* 69(1):616–624.
- Halvorson HO, Ziegler NR. 1933. Application of statistics to problems in bacteriology. I. A means of determining bacterial population by the dilution method. *J Bacteriol.* 25:101–121.
- Harinikumar KM, Bagyaraj DJ. 1988. Effect of crop rotation on native vesicular-arbuscular mycorrhizal propagules in soil. *Plant Soil.* 110:77–80.
- Hoeksema JD, Bala Chaudhary V, Gehring CA, Johnson NC, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC, Wilson GWT, Klironomos JN, Umbanhowar J. 2010. A Meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecol Lett.* 13:394–407.
- Ijdo M, Cranenbrouck S, Declerck S. 2011. Methods for large-scale production of am fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza.* 21:1–16.
- Ishii T. 2004. Vesicular-Arbuscular (VA) Mycorrhizae. <http://www.bio.kpu.ac.jp/pomlab/VAMinf.html>. (Diakses tanggal 22 Juli 2005)
- Juge C, Samson J, Bastien C, Vierheilig H, Coughlan A, Piché Y. 2002. Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. *Mycorrhiza.* 12:37–42.
- Koske RE, Gemma JN. 1989. A Modified procedure for staining roots to detect va mycorrhizas. *Mycol Res.* 92(4):468–488.
- Liao JP, Lin XG, Cao ZH, Shi YQ, Wong MH. 2003. Interactions between arbuscular mycorrhizae and heavy metals under sand culture experiment. *Chemosphere.* 50(6):847–853.
- Manian S, Edathil TT, Udaiyan K. 1995. Vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization and growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in autoclaved soil. *Pertanika J Trop Agric Sci.* 18:95–101.
- Marsh BB. 1971. Measurement of length in random arrangements of lines. *J Appl Ecol.* 8:265–267.
- Martin J, Sampedro I, Garcia-Romera I, Garcia-Garrido JM, Ocampo JA. 2002. Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Gly-*

- cine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and Phytotoxic effects of olive mill residues. *Soil Biol Biochem.* 34(11):1769–1775.
- Newman EI. 1966. A Method of estimating the total length of root in a sample. 1966. *J Appl Ecol.* 3:139–145.
- Nusantara AD, Kusmana C, Mansur I, Darusman LK, Soedarmadi H. 2011a. Performa fungi mikoriza arbuskula dan *Pueraria phaseoloides* yang dipupuk tepung tulang dengan ukuran dan dosis berbeda. *Media Peternakan.* 34(2):126–132.
- Nusantara AD, Kusmana C, Mansur I, Darusman LK, Soedarmadi H. 2011b. Ukuran diameter dan takaran vermikompos menentukan produksi inokulan fungi mikoriza arbuskula dan biomassa legum penutup tanah. *Biota.* 16(1):1–9.
- Nusantara AD. 2011. Pengembangan dan Pemanfaatan Inokulan Fungi Mikoriza Arbuskula Berbasis Bahan Alami untuk Produksi Bibit Jati (*Tectona grandis* L.f) [Disertasi]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- O'Connor PJ, Smith SE, Smith FA. 2001. Arbuscular mycorrhizal associations in the southern Simpson desert. *Aust J Bot.* 49:493–499.
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, Boller T. 2009. Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. *Agric Ecosyst Environm* 134:257–268.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transact Brit Mycol Soc.* 55:158–161.
- Pitet M, Camprubí A, Calvet C, Estaún V. 2009. A modified staining technique for arbuscular mycorrhiza compatible with molecular probes. *Mycorrhiza.* 19:125–131.
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V. 1983. Growth response of several plant species to mycorrhiza in a soil of moderate P fertility. 1. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil.* 70:191–209.
- Rajapakse S, Miller Jr JC. 1992. Methods for studying vesicular–arbuscular mycorrhizal root colonization and related root physical properties. *Methods Microbiol.* 24:302–316.



- Rillig MC, Mummey DL. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171:41–53.
- Rowell DL. 1995. *Soil Science. Methods and Applications*. Longman Scientific and Technical, Essex, UK.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001. A New fungal phylum, the glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res.* 105:1413–1421.
- Schüßler A, Walker C. 2010. *The Glomeromycota. A Species List with New Families and New Genera*. Kew: The Royal Botanic Garden Kew.
- Siddiqui ZA, Kataoka R. 2011. Mycorrhizal inoculants: progress in inoculant production technology *dalam* Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J. (eds.). *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. Springer Science+Business Media. New York: Hlm. 489–506.
- Sieverding E. 1991. *Vesicular–Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agroecosystems*. Bremen, Germany: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit.
- Simanungkalit RDM. 2003. Teknologi fungi mikoriza arbuskuler: Produksi inokulan dan pengawasan mutunya *dalam* Simarmata T, Arief DH, Sumarni Y, Hindersah R, Azirin A, Kalay AM. (eds.). *Teknologi Produksi dan Pemanfaatan Inokulan Endo-Ektomikoriza untuk Pertanian, Perkebunan, dan Kehutanan*. Prosiding Seminar Mikoriza, Asosiasi Mikoriza Indonesia dan Fak. Pertanian UNPAD, Bandung 16 September 2003. Hlm. 7–17.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press.
- Sylvia DM. 1994. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *dalam* Klute A. (ed.). *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, Inc. Hlm. 351–378.
- Tallaksen J. 1997. Use of mycorrhizal inoculum as a soil amendment during prairie restoration. *Restor Reclam Rev.* 2:1–7.
- Tarbell TJ, Koske RE. 2007. Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inocula in a sand/peat medium. *Mycorrhiza.* 18:51–56.

- Tennant D. 1975. A Test of a modified line intersect method of estimating root length. *J Ecol.* 63: 995–1001.
- Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl Environm Microbiol.* 64(12): 5004–5007.
- Vogelsang KM, Bever JD. 2009. Mycorrhizal densities decline in association with nonnative plants and contribute to plant invasion. *Ecology.* 90:399–407.
- Vosátka M, Albrechtová J. 2009. Benefits of arbuscular mycorrhizal fungi to sustainable crop production *dalam* Khan MS, Zaidi A, Mussarat J. (eds.). *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Berlin: Springer-Verlag. Hlm. 205–224.

# Profil Penulis



**Dr. Ir. Abimanyu Dipo Nusantara, M.P** dilahirkan di Kota Purworejo, Jawa Tengah pada tanggal 25 Desember 1956. Penulis merupakan putra ketiga dari pasangan suami istri Drs. Sru Adji Surjadi (alm.) dan Hj. Sumarni. Pendidikan dasar sampai sarjana diselesaikan di Kota Jember, Jawa Timur. Gelar sarjana ilmu pertanian diperoleh pada tahun 1981 dari Jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Selepas memperoleh gelar sarjana, penulis bekerja sebagai dosen di Universitas Wisnuwardhana, Malang, Universitas Bondowoso, dan Universitas Moch. Sroedji, Jember, Jawa Timur. Pada tahun 1986, penulis *bedhol deso* ke Bengkulu untuk bekerja sebagai tenaga pengajar pada Fakultas Pertanian Universitas Bengkulu sampai sekarang. Pendidikan Pascasarjana diselesaikan pada tahun 1994 pada jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Pada tahun 2011 penulis mendapatkan gelar Doktor dari Program Studi Ilmu Kehutanan Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Semenjak bekerja sebagai tenaga pengajar di Universitas Bengkulu, penulis menekuni bidang Biologi Tanah dengan penekanan pada pemanfaatan sumber daya alam dan hayati untuk peningkatan produktivitas tanah dan tanaman. Penulis telah beberapa kali memperoleh dana hibah penelitian dan pengabdian pada masyarakat dari Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan termasuk dari SEAMEO BIOTROP. Dari hasil penelitian tersebut, telah cukup banyak artikel ilmiah yang penulis terbitkan pada jurnal ilmiah terakreditasi maupun tidak terakreditasi dan pada beberapa fora nasional dan internasional. Penulis juga aktif sebagai pelatih pada pelatihan Reklamasi Lahan Pascatambang, Penelusuran Pustaka Digital, dan Bekerja dengan Fungi Mikoriza Arbuskula. Penulis merupakan anggota aktif dari Himpunan Ilmu Tanah Indonesia dan Asosiasi Mikoriza Indonesia.



**Dr. Ir. Rr. Yudhy Harini Bertham, M.P** dilahirkan di kota Surabaya, Jawa Timur pada tanggal 30 April 1958. Penulis merupakan putri pertama dari pasangan suami istri R. Harry Bertham (alm.) dan Soesiloadjeng (alm.). Pendidikan dasar sampai menengah diselesaikan di kota Mojokerto dan Surabaya, Jawa Timur. Selepas pendidikan menengah atas, kemudian pindah ke Kota Jember untuk menempuh pendidikan sarjana pertanian di Fakultas

Pertanian Universitas Jember. Gelar sarjana ilmu pertanian diperoleh pada tahun 1984 dari jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian Universitas Jember. Selepas memperoleh gelar sarjana, penulis bekerja sebagai dosen di Universitas Bengkulu mulai tahun 1986 sampai sekarang. Pendidikan Pascasarjana diselesaikan pada tahun 1991 pada jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Pada tahun 2006 penulis mendapatkan gelar Doktor dari Program Studi Ilmu Kehutanan Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Penulis menekuni bidang Biologi Tanah dengan penekanan pada pemanfaatan sumber daya alam dan hayati (bakteri dan fungi) untuk peningkatan produktivitas tanah dan tanaman. Penulis telah melaksanakan banyak penelitian dan pengabdian kepada masyarakat yang pada umumnya didanai Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan. Dari hasil penelitian tersebut, telah cukup banyak artikel ilmiah yang penulis terbitkan pada jurnal ilmiah terakreditasi maupun tidak terakreditasi dan pada beberapa forum nasional. Penulis merupakan anggota aktif dari Himpunan Ilmu Tanah Indonesia dan Asosiasi Mikoriza Indonesia.



**Dr. Ir. H. Irdika Mansur, M.For.Sc.** dilahirkan di Manokwari pada tanggal 23 Mei 1966. Pendidikan dasarnya diselesaikan di Madiun. Setelah menyelesaikan tingkat SMA di SMAN 1 Madiun, penulis hijrah ke Bogor untuk mendalami ilmu silvikultur (budi daya hutan) di Program Studi Budi Daya Hutan, Jurusan Manajemen Hutan, Fakultas Kehutanan IPB dan berhasil meraih gelar Sarjana Kehutanan pada tahun 1988. Selesai kuliah, penulis diangkat sebagai staf pengajar di almamaternya (sekarang menjadi Departemen Silvikultur) sampai sekarang untuk mengajar beberapa mata kuliah, yaitu Silvika, Silvikultur, dan Agroforestri untuk program sarjana, serta Ilmu dan Teknologi Mikoriza dan Ekologi Restorasi untuk program pascasarjana (Master dan Doktor). Penulis menyelesaikan pendidikan Master di School of Forestry, University of Canterbury, Selandia Baru tahun 1994 dan pendidikan Doktor di Departemen of Biosciences, University of Kent, Inggris tahun 2000. Penulis pernah menduduki jabatan sebagai Manajer Hutan Pendidikan Gunung Walat Fakultas Kehutanan IPB, Ketua Jurusan Manajemen Hutan, dan Ketua Departemen Silvikultur pada fakultas yang sama. Saat ini penulis dipercaya sebagai Wakil Direktur SEAMEO BIOTROP. Penulis juga aktif di beberapa organisasi ilmiah dan profesional, antara lain Asosiasi Mikoriza Indonesia (AMI), Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia (PERMI), Forum Reklamasi Hutan pada Lahan Bekas Tambang (RHLBT), dan Asosiasi Hutan Tanaman Rakyat Mandiri Indonesia. Penelitian terkait mikoriza dilakukan penulis bersama mahasiswa bimbingan program sarjana maupun pascasarjana dari berbagai program studi untuk bermacam jenis tanaman, mulai dari pertanian, pakan ternak, perkebunan, maupun kehutanan.

